

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point d'un modèle de Sénescence Induite Prématurément par un Stress unique, au t-BHP ou à l'éthanol, sur des fibroblastes humains diploïdes WI-38 et WI38/h-TERT

Ghiteșcu, Simona

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Mise au point d'un modèle de Sénescence Induite Prématurément par un
Stress unique, au *t*-BHP ou à l'éthanol, sur des fibroblastes humains diploïdes
WI-38 et WI-38/h-TERT**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Simona GHITESCU

Juin 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72 44 - Téléfax: + 32(0)81.72.4420
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Mise au point d'un modèle de Sénescence Induite Prématûrément par un
Stress unique, au *t*-BHP ou à l'éthanol, sur des fibroblastes humains diploïdes
WI-38 et WI-38/h-TERT**

GHITESCU Simona

Résumé

Des fibroblastes humains diploïdes jeunes de la souche WI-38 exposés à 5 stress subcytotoxiques répétés quotidiennement au *tert*-butyl hydroperoxyde (*t*-BHP) ou à l'éthanol présentent, deux à trois jours après le dernier stress, des biomarqueurs caractéristiques de cellules en Sénescence Réplivative (SR) (ex : activité S-A β -galactosidase, arrêt de prolifération, etc.). Ce phénomène est appelé la Sénescence Induite Prématûrément par les Stress (SIPS).

Notre travail a consisté en l'adaptation du modèle existant de SIPS induite par le *t*-BHP ou l'éthanol sur des fibroblastes humains pour mener à bien une étude fonctionnelle de certains gènes potentiellement impliqués dans l'apparition du phénotype sénéscent lors de la SIPS.

Dans un premier temps, nous avons mis au point un modèle de sénescence induite prématurément par un stress unique de 2 heures au *t*-BHP ou à l'éthanol chez des fibroblastes de la souche WI-38, qui pourra être utilisé pour l'analyse fonctionnelle de certains gènes surexprimés de manière transitoire dans ces cellules. Nous avons ensuite adapté ce modèle à des fibroblastes de la lignée de fibroblastes immortalisés WI-38/h-TERT de façon à pouvoir réaliser l'étude fonctionnelle envisagée par transfection stable.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2004

Promoteur: O. Toussaint

Je remercie tout d'abord le professeur J . Remacle pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Merci au professeur Olivier Toussaint de m'avoir accueillie dans l'équipe des GRAS, ainsi que pour ses conseils et sa bonne humeur.

*Un **grand merci** à Thierry pour sa patience, ses conseils et pour m'avoir aidée dans la rédaction de mon mémoire.*

Un autre grand merci, à François, pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée au laboratoire.

Merci à Florence pour avoir corrigé une partie de mon mémoire.

Merci à toute l'équipe des GRAS, pour m'avoir si chaleureusement accueillie parmi eux.

Merci à tous les autres étudiants en bio, surtout les Bio Humaines, avec qui j'ai partagé les joies et les peines de ces années d'étude .

Et merci, enfin, à mes parents, pour m'avoir soutenue et encouragée pendant toute la durée de ces études.

Simona

Table des matières

I : Introduction

1) <i>Sénescence réplivative</i>	1
2) <i>Sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)</i>	1
3) <i>Biomarqueurs de la sénescence réplivative et de la SIPS</i>	1
1) Morphologie cellulaire.....	1
2) Activité β -galactosidase associée à la sénescence(SA- β -gal).....	2
3) Délétion de l'ADN mitochondrial.....	2
4) Raccourcissement des télomères et perte du potentiel répliatif.....	2
5) Régulation du cycle cellulaire.....	4
6) Changement du niveau d'expression de certains gènes.....	5
4) <i>Transduction du signal en SIPS</i>	5
5) <i>Modèles de SIPS in vitro</i>	6
6) <i>Modèle à 5 stress répétés avec t-BHP sur fibroblastes WI-38 et modèle à stress unique avec H₂O₂ sur fibroblastes IMR-90</i>	6
1) Détermination de concentrations subléthales de t-BHP.....	6
2) Effets des stress subléthaux sur l'index mitotique et la prolifération cellulaire.....	7
3) Activité SA- β -Galactosidase.....	7
4) Expression de p21 ^{Waf-1/SDI-1/Cip1} et phosphorylation de pRb.....	7
5) Expression des gènes dans la SR et 72 h après des stress subléthaux avec H ₂ O ₂ ou ...	7
t- BHP	
6) La délétion de 4977 bp de l'ADN mitochondrial.....	8
7) <i>Stress à l'éthanol</i>	8
8) <i>Études fonctionnelles de gènes</i>	9
9) <i>But du mémoire</i>	10

II : Matériel et méthodes

1) <i>Repiquage des cellules</i>	11
2) <i>Stress au t-BHP et à l'éthanol</i>	12
3) <i>Détermination de la viabilité cellulaire par la méthode du MTT</i>	13
4) <i>Détection de l'activité SA-β-Galactosidase</i>	13
5) <i>Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée</i>	14
6) <i>Analyse statistique des résultats</i>	14

III : Résultats et discussion

1) <u>Mise au point d'un modèle de SIPS à stress unique sur des FHD WI-38</u>	
1-a) <i>Détermination de la dose subcytotoxique d'agent stressant</i>	15
1-b) <i>Détermination de la dose d'agent stressant nécessaire pour induire la SIPS</i>	16
1-c) <i>Conclusion</i>	17

2) <u>Mise au point de modèles de SIPS au t-BHP et à l'éthanol sur des FHD WI-38/h-TERT</u>	
2-a) <i>Détermination de la dose subcytotoxique d'agent stressant.....</i>	18
2-b) <i>Détermination de la dose d'agent stressant nécessaire pour induire la SIPS.....</i>	19
2-c) <i>Conclusion.....</i>	19
IV : Conclusion et perspectives.....	20
V : Bibliographie.....	22

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Activated Protein 1
Apo J	Apolipoprotéine J
ARN	Acide ribonucléique
ATF-2	Activating Transcription Factor 2
BME	Milieu basal de Eagle (Basal Eagle Medium)
CAK	CDK2 activating kinase
CDK	Cylin Dependent Kinase
CDKI	Cylin Dependent Kinase Inhibitor
CPD	Culmulative Population Doubling
CTL	Contrôle
cyc	Cycline
DHFR	Dihydrofolate réductase
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
EtOH	Ethanol
FBS	Foetal Bovine Serum
FHD	Fibroblastes Humains Diploïdes
GTP	Guanosine triphosphate
kb	kilobases
l	litre
M	molaire
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDM2	Mouse Double Minute 2
MEM	Modified Eagle Medium
MF	morphotype mitotique
μ	micro
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme réduite)
nm	nanomètres
pb	paires de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PMF	morphotype post-mitotique
pRb	protéine de Rétinoblastome
ROS	Reactive Oxygen Species
SA-β-Gal	activité β-Galactosidase associée à la sénescence
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SIPS	Senescence induite prématurément par les stress
SR	Sénescence Répllicative
SRE	Serum Responsive Element
SRF	Serum Responsive Factor
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxide
TCA	Acide Trichloroacétique
TGF	Transforming Growth Factor
UV	ultra-violet
X-gal	S-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-d-galactopyranoside

Introduction

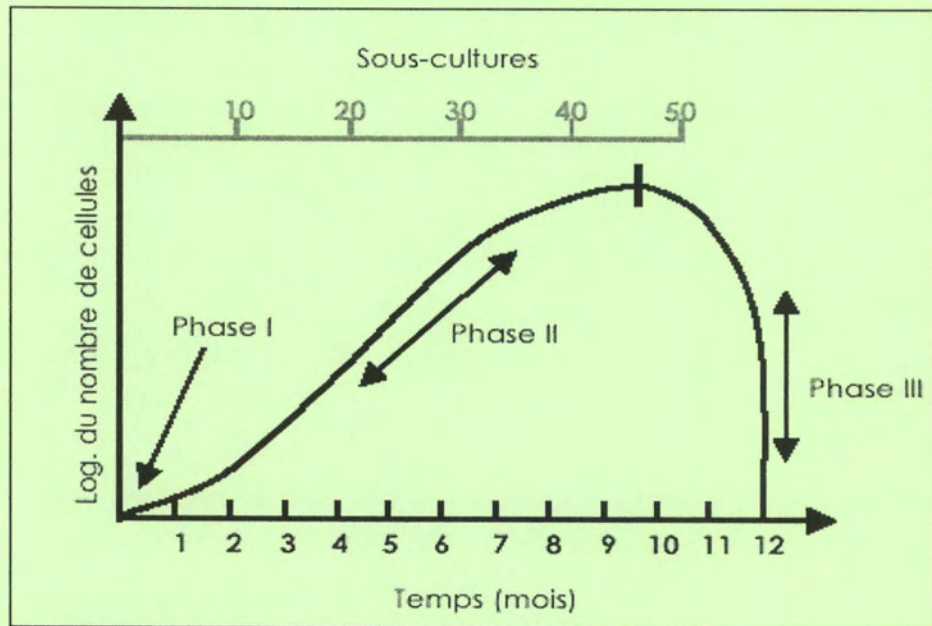


Fig I-1 : Modèle de Hayflick : représentation schématique du phénomène de sénescence répliquative des cellules en culture. (d'après Hayflick, 1977)

I. Introduction

1) *Sénescence répllicative (SR)*

Hayflick et Moorhead ont montré que les fibroblastes humains diploïdes (FHD) cultivés *in vitro* arrêtent irréversiblement de se diviser après un certain nombre de doublements de population (CPD=cumulative population doubling). Ce phénomène a été appelé sénescence répllicative. L'évolution des cultures cellulaires peut se diviser en trois phases :

- La phase I correspond à la mise en culture des cellules à partir d'un tissu d'origine.
- La phase II correspond à une croissance exponentielle des cellules.
- La phase III correspond à un ralentissement des divisions cellulaires, conduisant finalement à un arrêt irréversible des mitoses (Hayflick L *et al*, 1961) (Fig I-1).

Outre cet arrêt irréversible des divisions, les FHD présentent d'autres caractéristiques de la sénescence : morphologie typique (cellule étalée), accumulation de lipofuscine, activité β -galactosidase associée à la sénescence, délétion de l'ADN mitochondrial, changement du niveau d'expression de certains gènes (ex : Apo J, ostéonectine, fibronectine), changements d'activité de certaines enzymes (ex : métalloprotéinases) (pour une revue : Campisi J. *et al*, 1996).

2) *Sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)*

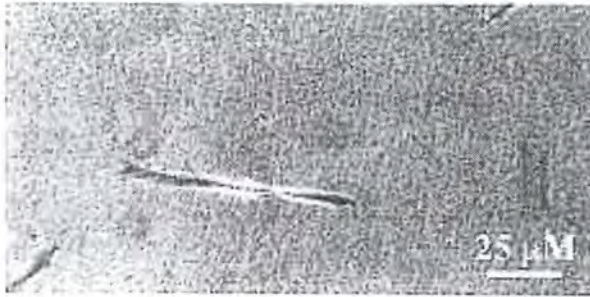
Des biomarqueurs de la sénescence répllicative apparaissent également chez des cellules jeunes quelques jours après qu'elles aient été soumises à des stress oxydatifs subcytotoxiques ou à des agents endommageant l'ADN. Ce phénomène est appelé SIPS (sénescence induite prématurément par les stress). La SIPS peut être définie comme une réponse à long terme des cellules prolifératives face à des stress subcytotoxiques. Ces stress peuvent être de différentes natures : rayons UV, H_2O_2 , *t*-BHP (*tert*-butylhydroperoxide), éthanol, mitomycine C, hyperoxie, etc. (pour une revue, voir Dierick JF *et al*, 2003).

3) *Biomarqueurs de la sénescence répllicative et de la SIPS :*

1) Morphologie cellulaire

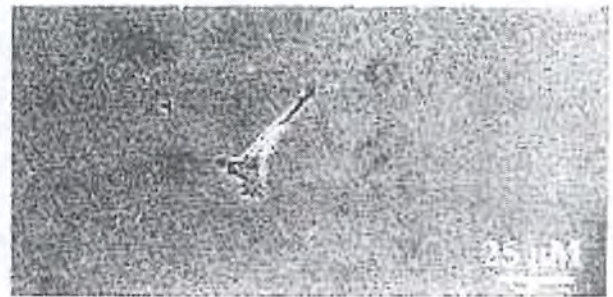
Bayreuther et son équipe ont défini, sur base d'observations microscopiques, 7 stades morphologiques distincts, appelés morphotypes, par lesquels les fibroblastes passent au cours de leur durée de vie proliférative *in vitro* (fig. I-2). Les 3 premiers sont des morphotypes mitotiques (MF I, II, III), les trois suivants sont des morphotypes post-mitotiques (PMF IV, V, VI) et le dernier est un morphotype nécrotique (PMF VII). Les cultures de fibroblastes jeunes contiennent surtout des morphotypes MF I et II. Au fur et à mesure des passages en culture, on observe une accumulation du morphotype MF III dans la culture, puis une accumulation des morphotypes post-mitotiques. Le PMF VII est rarement détectable et correspond à un PMF VI dégénéré. La proportion des différents morphotypes dans une culture est un indicateur de l'âge de cette culture. Après avoir travaillé avec des fibroblastes de peau humaine de la lignée cellulaire HH-8 stressés aux rayons UV, Bayreuther a observé que des fibroblastes soumis à des stress répétés acquièrent, quelques jours après les stress, une morphologie proche de celle des fibroblastes âgés (Rodemann HP *et al*, 1989).

MF I



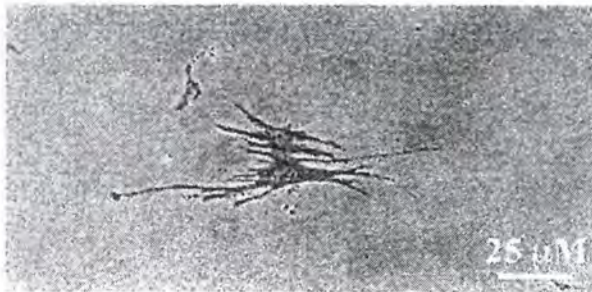
1)

MF II



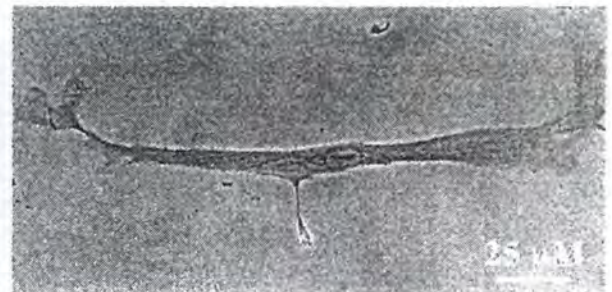
2)

MF III



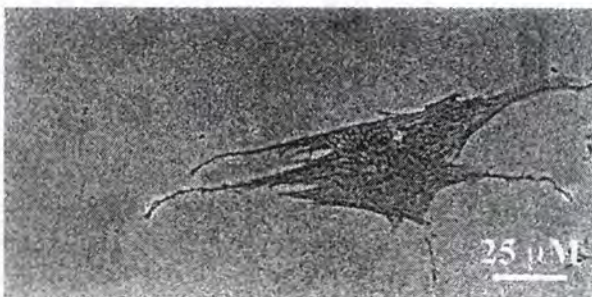
3)

PMF IV



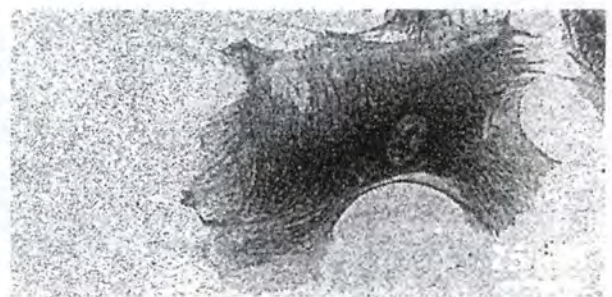
4)

PMF V



5)

PMF VI



6)

Fig I-2

Morphotypes mitotiques et post-mitotiques des FHD WI-38

1) Fibroblaste mitotique MF I ; 2) Fibroblaste mitotique MF II ; 3) Fibroblaste mitotique MF III ; 4) Fibroblaste post-mitotique PMF IV ; 5) Fibroblaste post-mitotique PMF V ; 6) Fibroblaste post-mitotique PMF VI

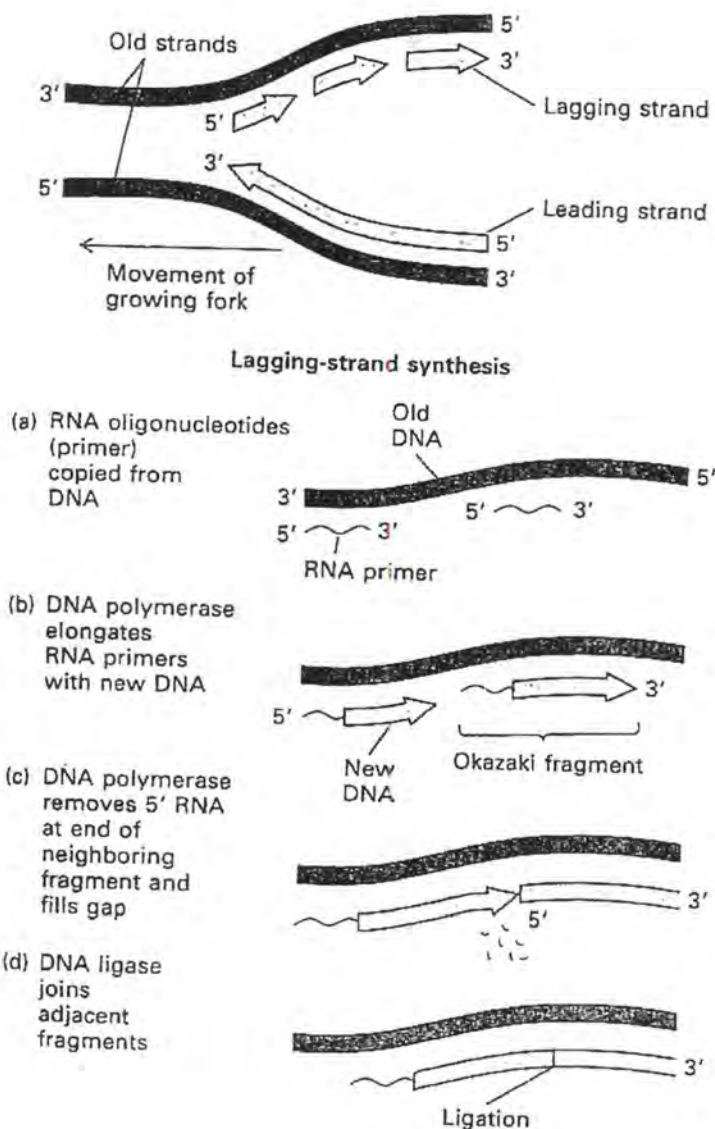


Fig I-3 Schéma de la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase (Lodish *et al.* 1995).

Le "leading strand" est répliqué de façon continue de 5' en 3'. Le "lagging strand" nécessite des amorces d'ARN pour pouvoir être synthétisé.

a) Les amorces d'ARN sont complémentaires à l'ADN.

b) L'ADN polymérase synthétise des fragments d'ADN (fragments d'Okazaki) pour allonger les amorces d'ARN.

c) L'ADN polymérase dégrade l'ARN à l'extrémité 5' du fragment et le remplace par de l'ADN.

d) L'ADN ligase joint les fragments adjacents.

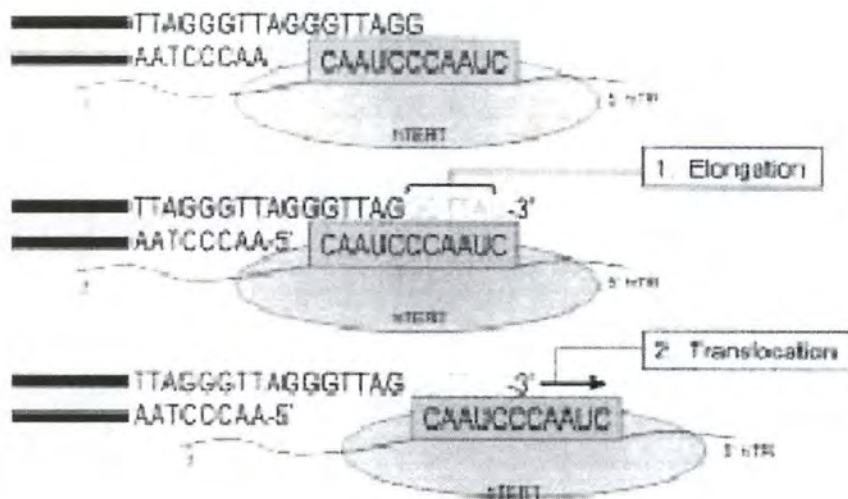


Fig I-4: La télomérase ajoute les répétitions hexamériques TTAGGG aux extrémités des chromosomes, en deux étapes: 1)élongation et 2)translocation. L'enzyme s'hybride via sa matrice ARN à l'extrémité du télomère au niveau de la structure simple brin la plus distale. L'extrémité télomérique est allongée par l'ajout de bases complémentaires à l'amorce d'ARN, via la sous-unité catalytique. Ensuite le complexe de la télomérase est transloqué vers l'extrémité et catalyse une nouvelle élongation (Granger MP *et al*, 2001).

2) Activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal)

Chez les cellules sénescents, on observe une activité β -galactosidase détectable à pH 6. Kurz *et al.* ont démontré qu'il s'agit en fait de l'activité β -galactosidase lysosomale classique (habituellement détectable à pH 4), mais dont l'expression est augmentée à cause de l'accroissement de la taille et du nombre des lysosomes au cours de la sénescence. La β -galactosidase est une hydrolase qui clive les résidus galactosyl terminaux de différents substrats tels que les gangliosides, glycoprotéines et glycosaminoglycans (Kurz D *et al.*, 2000). L-M Gerland *et al.* travaillent avec des FHD MRC5 et observent une accumulation de lipofuscine, de même qu'une augmentation de la taille des vacuoles autophagiques dans les cellules sénescents. Or la β -galactosidase s'accumule dans ces vacuoles. Dans les cellules âgées, les enzymes lysosomiales sont en moindre quantité, rendant ainsi les lysosomes et autolysosomes non-fonctionnels, ce qui conduira à une augmentation de la masse lysosomale et de l'activité β -galactosidase ainsi qu'à une accumulation d'autolysosomes avec de la lipofuscine (Gerland LM *et al.*, 2003).

L'apparition de l'activité SA- β -galactosidase dans la SIPS induite par H_2O_2 dépend de l'activation de la protéine de réponse au stress $p38^{MAPK}$ et du facteur de transcription ATF-2 (Fripiat C *et al.*, 2002).

3) Délétion de l'ADN mitochondrial

La mitochondrie possède son propre génome, sous forme d'ADN circulaire.

On connaît plus de 150 délétions de l'ADN mitochondrial. La plus fréquente est une délétion de 4977 pb, qui est associée au vieillissement cellulaire. La fréquence de cette délétion augmente avec l'âge *in vivo* et avec le nombre de CPD *in vitro*. La relation entre l'âge et la fréquence de cette délétion peut être expliquée par une exposition à des radicaux libres pendant une longue durée (Dierick JF *et al.*, 2003).

4) Raccourcissement des télomères et perte du potentiel réplicatif

Les télomères sont des séquences répétitives d'ADN, situées aux extrémités des chromosomes linéaires (répétition TTAGGG chez l'homme). À chaque cycle de réplication de l'ADN, quelques bases du côté 3' du télomère ne sont pas dupliquées et le télomère se raccourcit (fig. I-3). Chez l'homme, à la naissance, ils ont une longueur de 10 à 15 kb. Cette longueur diminue au cours des divisions chez les cellules somatiques. Cette perte se chiffre à environ 50 à 150 pb par passage en culture *in vitro* et de 15 à 50 pb par an *in vivo* (Harley C *et al.*, 1990). En effet, lorsque l'ADN polymérase duplique l'ADN, l'un des brins est répliqué de façon continue de 5' en 3', tandis que l'autre est synthétisé sous forme de fragments discontinus appelés fragments d'Okazaki qui ne peuvent être synthétisés qu'à partir d'une amorce d'ARN. Ces amorces sont dégradées au fur et à mesure qu'elles sont remplacées par de l'ADN. Mais la dernière amorce du côté 5' est dégradée sans être remplacée par de l'ADN. Donc le brin discontinu se raccourcit à chaque division cellulaire. Au-delà d'un certain nombre de divisions cellulaires, le télomère atteint une longueur critique et la cellule entre dans un état sénescents : elle arrête de se diviser et des biomarqueurs de la sénescence apparaissent.

La télomérase est une enzyme qui peut réparer les télomères, les allonger (fig. I-4). *In vivo*, cette enzyme est exprimée par les cellules germinales et par la plupart des cellules cancéreuses. La télomérase est composée d'une sous-unité catalytique (h-TERT) et d'une matrice ARN (sous-unité hTR). Il s'agit d'une transcriptase inverse capable d'ajouter les répétitions hexamériques TTAGGG aux extrémités des chromosomes, en deux étapes: élongation et translocation.

L'enzyme hybride sa matrice ARN à l'extrémité du télomère au niveau de la structure simple brin la plus distale. L'extrémité télomérique est allongée par l'ajout de bases complémentaires à l'amorce d'ARN, via la sous-unité catalytique. Ensuite le complexe de la télomérase est transloqué vers l'extrémité et catalyse une nouvelle élongation (Granger MP *et al*, 2001).

Sénescence répllicative: quand les télomères sont trop courts, cela conduit à une fusion des chromosomes, ce qui active la protéine p53, comme c'est le cas lorsque l'ADN est endommagé. De plus p53 déclenche la surexpression de p21^{waf-1}, qui est un inhibiteur des kinases dépendant de cyclines dont l'expression augmente pendant les 2-3 derniers passages en culture avant la sénescence, conduisant ainsi à un arrêt du cycle cellulaire. En effet les complexes CDK 4,6/cycline D et CDK 2/cycline E sont nécessaires à la phosphorylation de pRb, conduisant à la libération de E2F1 et permettant la transcription de gènes nécessaires à l'entrée en phase S (Von Zglinicki *et al*, 1995).

Qu'en est-il du raccourcissement télomérique lors de la SIPS ?

L'équipe de Von Zglinicki travaille avec des fibroblastes WI-38 (à 20 CPDs). Certains sont soumis à une hyperoxie de 40% d'O₂, d'autres sont en normoxie. Il observe que le raccourcissement télomérique passe de 90 pb par doublement de population en normoxie, à plus de 500 pb par doublement de population sous hyperoxie.

A la fois l'hyperoxie et le vieillissement, augmentent la concentration intracellulaire de radicaux libres oxygénés. Ces radicaux libres génèrent des dommages dans l'ADN, sous forme de cassures simple-brin, qui entraînent l'arrêt du cycle cellulaire via la voie dépendante de p53. Or, c'est cette même voie qui conduit à l'inhibition de la prolifération lors de la sénescence.

Les cassures simple-brin générées par les radicaux libres semblent être la cause majeure du raccourcissement télomérique, même en conditions de normoxie. La réplication terminale incomplète du « lagging strand » ne fait perdre aux télomères que quelques paires de bases par doublement de population et possède donc un rôle négligeable dans le raccourcissement télomérique, par rapport aux radicaux libres, même en normoxie.

Les fibroblastes soumis à l'hyperoxie sont très semblables aux fibroblastes sénescents et présentent les mêmes biomarqueurs (morphologie sénescence, accumulation de lipofuscine, etc.), y compris le raccourcissement des télomères (Von Zglinicki T *et al*, 1995)

Au cours de sa thèse de doctorat, réalisée au sein de notre laboratoire, Patrick Dumont a travaillé avec un modèle de SIPS induite par H₂O₂ sur des fibroblastes IMR-90, et a observé un arrêt de croissance, une activité SA- β -galactosidase, une morphologie sénescence mais pas de raccourcissement important des télomères (Dumont P *et al*, 2001)

Par la suite, des expériences ont été faites sur des FHD exprimant ou pas la sous-unité catalytique h-TERT de la télomérase. Ces cellules ont été soumises à des doses subcytotoxiques de H₂O₂, UVB, des radiations γ , induisant la SIPS. On a observé que ces cellules stressées exprimaient différents biomarqueurs de la sénescence bien qu'elles soient ou non transfectées avec h-TERT. Le fait de posséder h-TERT ne protège donc pas les cellules de la SIPS, on peut donc en déduire que celle-ci est induite chez les cellules indépendamment du raccourcissement des télomères (Magalhaes JP *et al*, 2002)(Gorbunova V *et al*, 2002).

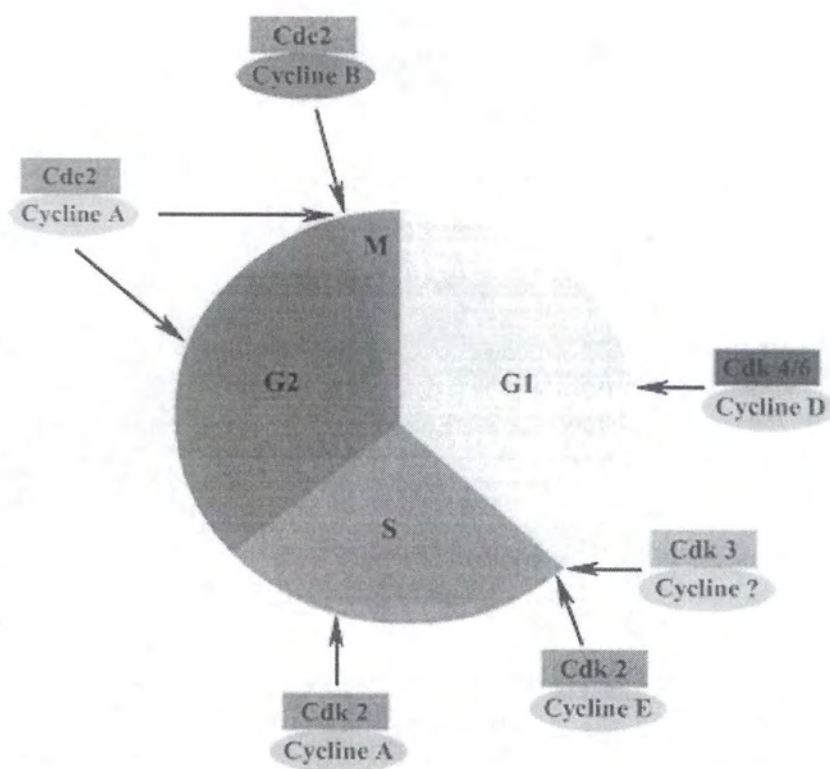


Fig I-5 : Représentation du rôle des différents complexes Cycline-CdK pendant le cycle cellulaire.
(Pires J, 1995)

5) Régulation du cycle cellulaire (pour une revue voir Campisi J *et al*, 1996)

Le cycle cellulaire comporte 4 étapes :

- G1 (GAP 1) : la cellule grossit et fabrique de nouvelles protéines
- S (Synthèse) : la cellule duplique son ADN
- G2 (GAP 2) : la cellule se prépare pour la mitose
- M (mitose) : la cellule-mère se divise en 2 cellules-filles, possédant chacune un jeu complet de chromosomes.

NB : Les phases G1, S et G2 constituent l'interphase.

La cellule peut sortir du cycle et rester quiescente (phase G0), par exemple en l'absence de facteurs de croissance. Le point de restriction, c'est-à-dire le moment dont va dépendre l'entrée ou non de la cellule dans le cycle, se situe à la fin de l'étape G1. Toutes ces étapes sont régulées par une famille de sérine/thréonine kinases, appelées CDK (Cyclin Dependent Kinases). Pour acquérir leur activité kinase, les CDK doivent s'associer à une sous-unité régulatrice appelée cycline (fig. 1-5).

Les cellules sénescents sont incapables d'entrer en phase S.

Quels sont les mécanismes moléculaires conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence ?

a) La répression des gènes de réponse précoce aux mitogènes (early response genes)

Ces gènes sont induits rapidement après une stimulation des cellules par des facteurs de croissance. Un de ces gènes est le proto-oncogène *c-fos*. Chez les fibroblastes sénescents, la transcription de *c-fos* n'est plus induite par les mitogènes.

Chez les fibroblastes jeunes, les mitogènes induisent des voies de transduction du signal impliquant la MAPK ERK, qui aboutissent par l'activation du gène *c-myc*. La protéine c-Myc active la protéine SRF (Serum Responsive Factor), qui va se fixer sur le site consensus SRE (Serum Responsive Element) du promoteur du gène *c-fos* dont la transcription est alors déclenchée. Dans les cellules âgées, SRF devient hyperphosphorylé (donc inactif) et ne se fixe plus à SRE. Par conséquent, *c-fos* n'est plus transcrit. Or *c-fos* code pour une sous-unité du facteur de transcription AP-1, qui est nécessaire pour l'entrée de la cellule en phase S.

b) Répression de gènes de la phase G1/S

Certaines enzymes, comme la dihydrofolate réductase (DHFR), la thymidine kinase, la thymidine synthétase, la thymidylate synthétase, sont nécessaires à la transition G1/S. La transcription de DHFR nécessite l'hétérodimère E2F1/DP1. Or E2F1 est réprimé dans les cellules sénescents.

c) Répression de cyclines et de kinases dépendantes de cyclines (CDK)

Certaines cyclines et CDK ne sont plus transcrites dans les cellules âgées ; par exemple CDK2, cyc A, cyc B. L'expression de la cycline A se fait via l'intervention du facteur de transcription E2F1, dont le niveau d'ARNm diminue dans les cellules âgées.

Certains complexes cycline-CDK n'ont plus d'activité enzymatique dans les cellules âgées.

C'est le cas des complexes cyc E- CDK, cyc D- CDK.

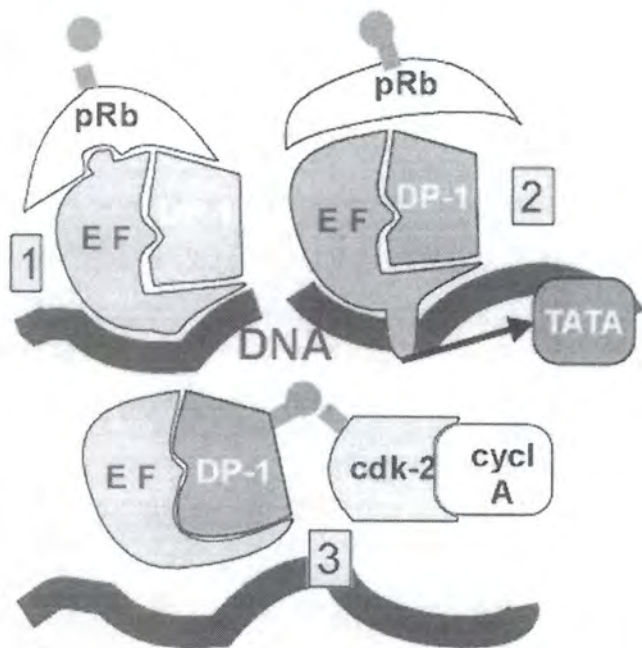


Fig I-6: Explication du fonctionnement du facteur de transcription E2F – DP1.

En [1], pendant la phase G1, la protéine pRb empêche le facteur de transcrire.

En [2], en début de phase S, la protéine pRb est phosphorylée par CDK 4/6-cyc D, puis par CDK 4/6-cyc E, elle modifie sa forme, libère le facteur de transcription qui se lie aux éléments de la boîte TATA et induit l'expression de ses gènes cibles.

En [3], en milieu de phase S, le complexe CDK 2-cycline A apporte un complexe phosphate à la molécule DP-1, qui inactive le facteur de transcription.

(<http://www.baclesses.fr/cours/fondamentale/4-division-cellulaire/Divis-i-13.htm>)

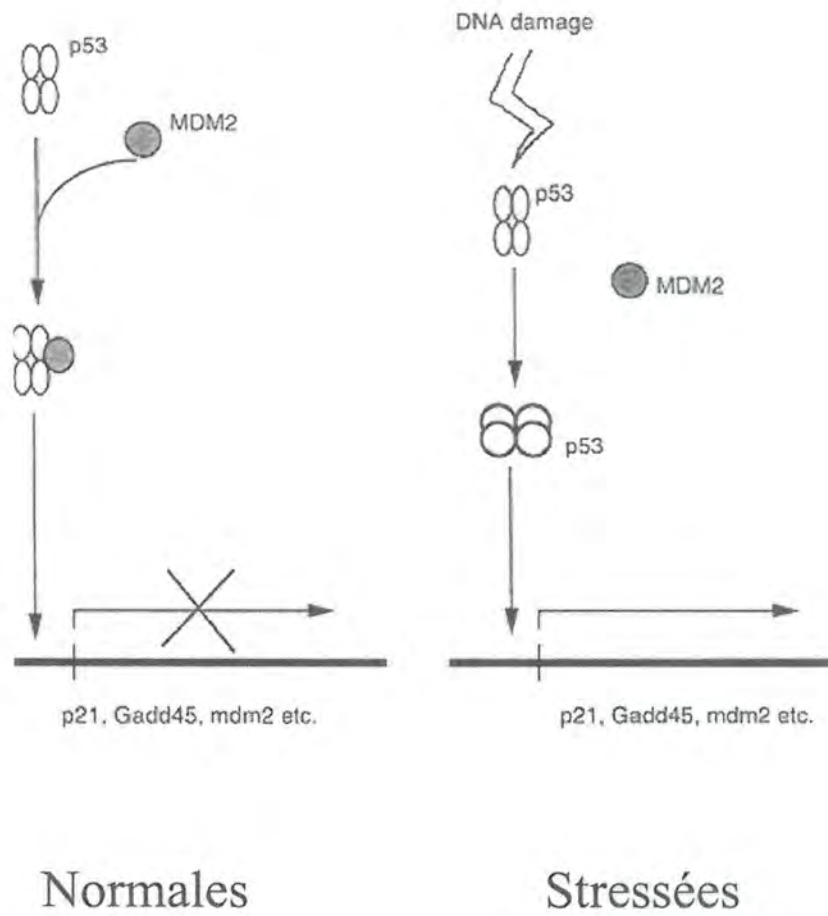


Fig I-7: En conditions normales p53 s'associe avec son inhibiteur MDM2 et les gènes sous la dépendance de p53 ne sont pas transcrits. En conditions de stress, (par exemple des radiations ionisantes), p53 est phosphorylé et sa conformation change. De ce fait MDM2 ne peut plus se lier à p53, donc l'inhibition de la transcription des gènes sous la dépendance de p53 est levée. (Shieh *et al*, 1997)

Régulation du cycle cellulaire		
CDK2/CDK1 (Kinasé dépendante des cyclines-1)	Rôle dans la progression à travers les phases G2 et M	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
CDK1 (Kinasé dépendante des cyclines-2)	Rôle dans la progression à travers les phases G1/S et S	Sous-expression de l'ARNm; réduction de la phosphorylation
CDK4 (Kinasé dépendante des cyclines-4)	Rôle dans la progression à travers la phase G1	Sous-expression de l'ARNm ou pas de changement suivant la lignée cellulaire de HDFs
Cycline A	Composant régulateur des CDKs	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
Cycline B		
Cycline D1	Composant régulateur des CDKs	Sous-expression de l'ARNm ou surexpression suivant la lignée cellulaire de HDFs
Cycline E		
Cycline D3	Composant régulateur des CDKs	Diminution de l'induction par le serum
Cycline H	Composante de la cyclin-accusé kinase (CAK)	Sous-expression de l'ARNm
p16 ^{INK4A}	Inhibiteur de CDK4 et CDK6	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
p15 ^{INK4B} (CDKN2A)	Inhibiteur des complexes cyclines-CDKs	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
ADN: Synthèse des protéines, réparation et structure		
PCNA (Antigène nucléaire de prolifération cellulaire)	Cofacteur de la polymérase δ	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
Polymérase α	Synthèse de l'ADN	Sous-expression de la protéine
PARP1/BERM2 (Libération de l'ADNase) (sub-unités M1 et M2)	Production de dérivés nucléotidiques pour la synthèse d'ADN	Sous-expression de l'ARNm
Thymidine kinase	Conversion de la thymidine en thymidylate (thymidine-5'-monophosphate, TMP); étape de la biosynthèse du nucléotide	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
Thymidylate synthase	Méthylation de la 2'-désoxyuridine 5'-monophosphate (dUMP) pour former le TMP, étape de la biosynthèse du nucléotide	Sous-expression de l'ARNm
H1, H2a, H2b, H3, H4 (Histones)	Structure de la chromatine	Sous-expression de l'ARNm
PARP/ADPRT (Poly(ADP-ribose) polymérase/ADP ribosyltransférase)	Protéine associée à la chromatine; rôle dans la réparation des dommages à l'ADN	Sous-expression de la protéine
Ka exonuclease	Hélicase; rôle dans la reconnaissance des dommages à l'ADN	Diminution de l'abondance de la protéine dans le noyau
Topsomerase I	Modifie la topologie de l'ADN	Sous-expression de l'ARNm/absence d'activité
Dihydrofolate réductase	Catalyse la réduction du folate en dihydrofolate, étape de la synthèse des acides aminés, des purines et du thymidylate	Sous-expression de l'ARNm
EF-1a (Facteur d'élongation-1a)	Synthèse des protéines	Sous-expression de la protéine
L1, L7, P1, S2, S6, S10	Protéines ribosomales	Sous-expression de l'ARNm
Matrice extracellulaire		
Collagène $\alpha1(I)$	Composant de la matrice extracellulaire	Surexpression ou sous-expression de l'ARNm
Collagène $\alpha2(I)$	Composant de la matrice extracellulaire	Sous-expression de l'ARNm
Collagène $\alpha1(III)$	Composant de la matrice extracellulaire	Sous-expression de l'ARNm
Elaine	Composant majeur des fibres élastiques	Sous-expression de l'ARNm
Fibronectine	Composant de la matrice extracellulaire	Surexpression de l'ARNm
Chaine α de la laminine	Glycoprotéine de la membrane basale	Sous-expression de l'ARNm
Protéases de la matrice extracellulaire		
CGNMP1 (Collagénase)	Métalloprotéinase de la matrice extracellulaire; remodelage de la matrice extracellulaire	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
PLATN-PA (Tissue-type plasminogen activator)	Sérine protéase qui active le plasminogène en plasminine	Surexpression de la protéine
PAU-PA	Activateur du plasminogène urinaire	Surexpression de la protéine
STYMMP3 (Stromelysine)	Remodelage de la matrice extracellulaire	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
Inhibiteurs de protéases de la matrice extracellulaire		
PAI-1, PAI-2 (Plasminogène activateur inhibiteurs-1 and -2)	Inhibiteurs de l'activateur du plasminogène; limite la fibrinolyse	Surexpression
TIMP-1 (Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases-1)	Inhibiteur des métalloprotéinases de la matrice; limite la dégradation de la matrice extracellulaire	Sous-expression de la protéine
TIMP-2 (Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases-2)	Inhibiteur des métalloprotéinases de la matrice; limite la dégradation de la matrice extracellulaire	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
HIC-1 (Mitogen inducible gene 2)	Inhibiteur des métalloprotéinases de la matrice; limite la dégradation de la matrice extracellulaire	Sous-expression de l'ARNm
Protéines lysosomales		
Cathepsine B	Cystéine protéase lysosomale	La forme deux chaînes est surexprimée; la forme une chaîne est sous-exprimée
Terminase	Protéine lysosomale	Clivage de la forme 90 kDa en une forme de 60 kDa
Antioxydants		
Catalase	Dégrade l' H_2O_2	Surexpression de la protéine
hSOD1	Superoxyde dismutase mitochondriale	Sous-expression, surexpression ou pas de changement de l'ARNm

Gène/protéine	Description	Modification avec la sénescence
Inhibiteurs de croissance		
BPC-1/PEDF (Early PDL cDNA-1/Plégement épithélial dérivé factor)	Inhibiteur de la croissance; marqueur de la phase G ₀ ; Facteur de différenciation; facteur neurotrophique	Sous expression de l'ARNm et de la protéine
HIC-1 (Hydrogène peroxyde inducible clone-3)	Inducible par H_2O_2 ; inhibiteur de la croissance	Surexpression de l'ARNm
p15 ^{INK4}	Inhibiteur de la croissance	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
Prothibine	Inhibiteur de la croissance; suppresseur de tumeur	Perte de modifications post-traductionnelles
Proème du rétrovirus (p15)	Inhibiteur de la croissance; suppresseur de tumeur	Absence de phosphorylation
Statine	Protéine nucléaire; s'associe à p15	Surexpression de la protéine
Facteurs de croissance/cytokines		
Hérogiline	Activateur du récepteur à tyrosine kinase ERBB2	Surexpression de l'ARNm
IGF-1 (Insulin-like growth factor-1)	Facteur de croissance	Sous-expression de l'ARNm
Interleukin- β	Cytokine; interfère avec l'action mitogénique des facteurs de croissance	Surexpression de la protéine
Interleukin- γ	Cytokine; interfère avec l'action mitogénique des facteurs de croissance	Surexpression de l'ARNm
Interleukine-1 α et - β	Cytokine; médiateur de la réponse osseuse; inflammation et immunité	Surexpression de l'ARNm
Interleukine-6	Cytokine; réponse de phase aiguë dans le foie; favorise la croissance des hybridomes; activité antivirale	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
Récepteurs/Binding proteins		
Antigène CD44	Molécule d'adhésion cellulaire; glycoprotéine transmembranaire qui lie l'hyaluronate et l'ostéopontine	Surexpression de l'ARNm
IGF-R (Récepteur au facteur de croissance épidermique)	Récepteur de facteur de croissance	Perte de l'activité tyrosine kinase
IGFBP-3 (Insulin-like growth factor binding protein-3)	Lie la protéine IGF-1	Surexpression de l'ARNm et de la protéine
IGFBP-5 (Insulin-like growth factor binding protein-5)	Lie la protéine IGF-1	Surexpression de l'ARNm
Inductible par les interférons		
3-5 AS (2',5' oligoadénylate synthase)	Polymérise l'ATP en oligomères liés en 2',5'	Surexpression de l'ARNm
IFN-16 (Protéine 6-16 inducible par l'interféron)	Activé par IFN- α et IFN- β mais pas par IFN- γ	Surexpression de l'ARNm
Chaîne respiratoire mitochondriale		
Cytochrome b	Composant de la chaîne respiratoire; transporteur d'électrons	Surexpression de l'ARNm
Sub-unité 4 de la NADH déshydrogénase	Composant du complexe I qui accepte les électrons de la NADH et transfère ceux-ci vers l'ubiquinone	Surexpression de l'ARNm
Autres		
Aldehyde déshydrogénase-1	Rôle dans le métabolisme de l'alcool	Sous-expression de l'ARNm
HSPT0, 90	Protéines de choc thermique	Sous-expression de l'ARNm et de la protéine
Ornithine décarboxylase	Conversion de l'ornithine en putrescine; biosynthèse des polyamines	Sous-expression de la protéine; expression similaire de l'ARNm
LPC-1 (Late PDL cDNA-1)	p33; protéine de transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi	L'expression de l'ARNm a été plus couplée au cycle cellulaire
WS-10	Protéine liant le Ca^{++}	Surexpression de l'ARNm et de la protéine

Tableau I-1: Gènes ou protéines dont le niveau d'expression ou la régulation post-traductionnelle est modifiée chez les fibroblastes humains lors de la sénescence répliquative (d'après Cristofalo et al., 1998).

d) Induction de la synthèse d'inhibiteurs de CDK (CDKI)

Il y a 2 familles de CDKI (classifiées sur base des homologies de séquence)

- p21^{waf-1}, p27^{kip-1} et p57^{kip-2}
- La famille INK: p14^{INK-4c}, p15^{INK-4d}, p16^{INK-4a}, p19^{INK-4b/ARF}

Dans les cellules âgées, l'expression de p21^{waf-1}, p27^{kip-1} et p16^{INK-4a} augmente, ce qui bloque l'activité des complexes cycline D-CDK. Or un des rôles de ces complexes est de phosphoryler pRb. pRb non phosphorylé va séquestrer le facteur E2F (fig. I-6) qui est nécessaire à la transcription de DHFR et de la thymidine kinase (gènes impliqués dans la phase G1/S). Le cycle cellulaire sera donc bloqué. L'expression de p21^{waf-1} est induite par p53.

Chez les cellules jeunes, la protéine MDM2 est induite en réponse à des mitogènes. MDM2 se fixe sur p53. Alors l'activité de liaison à l'ADN de p53 diminue et p53 n'exerce plus son effet suppresseur de mitose. Dans les cellules âgées, l'expression de MDM2 n'est plus induite en réponse à des mitogènes, et p53 peut donc jouer son rôle de suppresseur de mitose.

En conditions de stress, p53 peut changer de conformation et ainsi échapper au contrôle de MDM2 (fig. I-7) (Shieh *et al*, 1997).

La transcription de p53 est activée en réponse aux dommages dans l'ADN. p53 se fixe sur le promoteur de p21 et induit sa transcription.

6) Changement du niveau d'expression de certains gènes

Plus de 80 gènes voient leur niveau d'expression varier durant le vieillissement *in vitro*. Ces gènes codent pour des inhibiteurs de croissance, des facteurs de croissance, des récepteurs, des régulateurs du cycle cellulaire, etc. (tableau I-1).

4) Transduction du signal en SIPS

Le stress subcytotoxique avec du H₂O₂ induit la phosphorylation et l'activation de la p38^{MAPK}. Un des rôles de cette kinase est d'activer le facteur de transcription ATF-2 en le phosphorylant, induisant ainsi la surexpression de TGF-β1. La sécrétion de TGF-β1 va activer le récepteur II au TGF-β, entraînant ainsi une phosphorylation continue de la p38^{MAPK} et de ATF-2. Une boucle de feed-back positif s'établira donc entre la surexpression de TGF-β1 et la phosphorylation de la p38^{MAPK}, conduisant à l'apparition de la SA-β-gal, de la morphologie sénescence et d'une surexpression de quatre gènes liés à la sénescence : fibronectine, ostéonectine, SM 22, apolipoprotéine J (fig I-8). Cependant l'apparition de ces biomarqueurs n'est pas immédiate car ce qui la déclenche, c'est l'interaction de ATF-2 phosphorylée avec la pRb hypophosphorylée, 24 h après le stress.

La phosphorylation de la p38^{MAPK} et de ATF-2 entraîne l'arrêt immédiat du cycle cellulaire via la répression de gènes de réponse précoce autres que *c-fos*. ATF-2 peut interagir avec pRb hypophosphorylé, à la place de E2F (qui est inactivé par l'hypophosphorylation de pRb), déclenchant ainsi la surexpression de la fibronectine, ostéonectine, SM 22, et apo J. Par contre d'autres gènes sous le contrôle de E2F ne seront plus transcrits, notamment la DHFR (dihydrofolate réductase) impliquée dans la synthèse de l'ADN.

Christophe Fripiat, qui a réalisé sa thèse de doctorat au sein de notre laboratoire, a observé que, dans des conditions non-stressantes, le fait de stimuler des fibroblastes IMR-90 avec TGF-β1, active une NADH oxydase de la membrane plasmique, déclenchant une surproduction de H₂O₂. Cela donne lieu à un stress oxydatif subcytotoxique constant, ainsi qu'une hypophosphorylation continue de pRb.

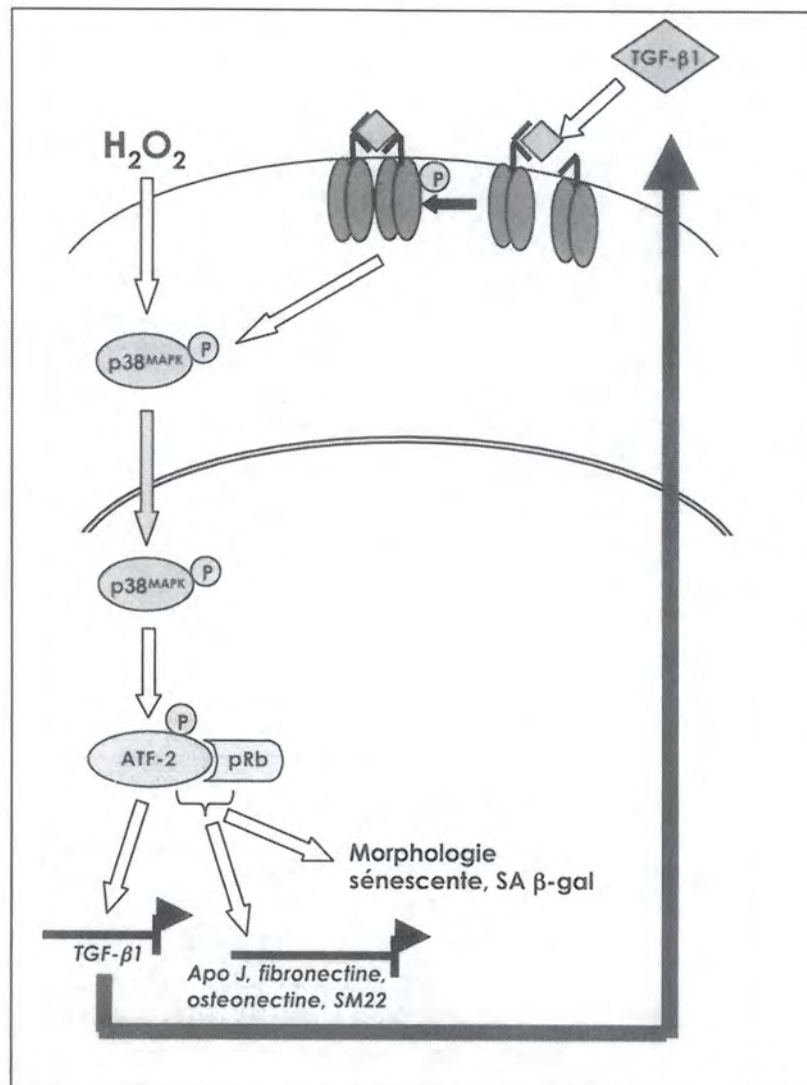


Fig.I-8 : Transduction du signal impliquée dans l'apparition des caractéristiques de la sénescence répliquative dans la SIPS induite par un stress subcytotoxique à l' H_2O_2 chez les HDFs IMR-90 (d'après Fripiat C. *et al.*, 2002).

En condition de stress, ces deux phénomènes se maintiennent pendant plusieurs jours, longtemps après l'arrêt du stress (Fripiat C *et al*, 2002).

Un autre rôle de TGF- β 1 est de bloquer le cycle cellulaire en phase G1 et de réprimer l'expression de CDK2. De plus TGF- β 1 inhibe la CAK (CDK2 activating kinase) et par conséquent bloque le complexe cycline E-CDK2.

5) Modèles de SIPS *in vitro*

Plusieurs travaux ont montré que des stress oxydatifs d'intensité relativement faible (subcytotoxiques) peuvent induire la SIPS.

Deux types de modèles sont utilisés pour déclencher la SIPS:

- 1) exposition chronique ou continue à un stress
- 2) exposition unique ou répétée au stress, après laquelle les cellules peuvent récupérer (Dumont P. *et al*, 1999)

Dans notre laboratoire, plusieurs modèles de SIPS ont été mis au point :

- Modèle de stress répétés avec du *t*-BHP (tert-butylhydroperoxide) ou de l'éthanol sur des FHDs WI-38
- Modèle à un stress unique avec H₂O₂ sur FHDs IMR-90
- Modèle de stress répétés aux UVB, sur des FHDs de peau

6) Modèle à 5 stress répétés avec *t*-BHP sur fibroblastes WI-38 et modèle à stress unique avec H₂O₂ sur fibroblastes IMR-90

Ces deux modèles ont été mis au point dans notre laboratoire par P. Dumont et O. Toussaint. Ils ont choisi d'analyser les biomarqueurs liés à la sénescence 2 à 24 jours après le stress, après avoir laissé aux cellules le temps de récupérer, afin d'éviter l'interférence entre les effets immédiats des stress et les effets à long terme. Les biomarqueurs étudiés sont : l'activité SA- β -galactosidase, l'expression de p21^{waf-1/SDI-1/Cip1}, le niveau de phosphorylation de pRb, l'arrêt de la prolifération, la délétion mitochondriale de 4977 bp, et l'expression d'une série de gènes associés à la sénescence.

1) Détermination de concentrations subléthales de *t*-BHP

Le *t*-BHP est un peroxyde organique générant des ROS (les radicaux hydroxyl, *t*-butoxyl, *t*-butylperoxyl), qui deviennent cytotoxiques à des fortes concentrations. Le *t*-BHP affecte les membranes biologiques, à cause de sa grande hydrophobicité. Même à basse concentration, le *t*-BHP induit la peroxydation des lipides cellulaires, conduisant ainsi à la mort cellulaire. De plus, le *t*-BHP inhibe la glutathion peroxydase, (détoxifiant les hydroperoxydes lipidiques), endommage l'ADN et les protéines (Ochi *et al*, 1989).

Pour déterminer la concentration subléthale de *t*-BHP, on stresse les cellules avec différentes concentrations de *t*-BHP, puis on détermine la viabilité cellulaire 24 h après le dernier stress. P. Dumont détermine que la concentration subléthale en *t*-BHP dans le modèle à 5 stress répétés est de 30 μ M.

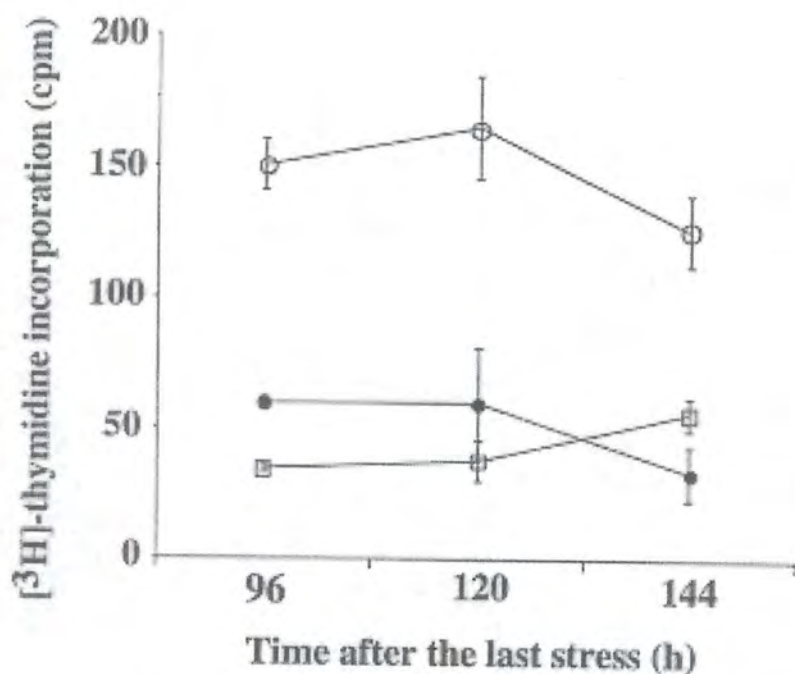


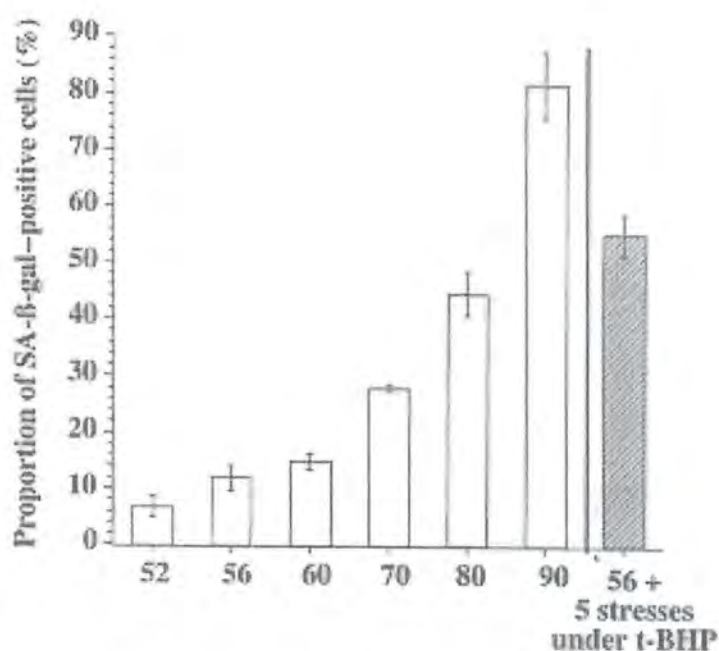
Fig I-9 : Effets à long terme des stress répétés avec du *t*-BHP sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes WI-38. A 96, 120, et 144h après le dernier stress, les cellules ont été incubées avec 1 μ Ci de thymidine tritiée pendant 3 h. Le niveau de radioactivité a été mesuré.

● = fibroblastes à 65% de leur durée de vie exposés au *t*-BHP

○ = fibroblastes à 65% de leur durée de vie non exposés au *t*-BHP

□ = fibroblastes à 95% de leur durée de vie non exposés au *t*-BHP

Les résultats sont exprimés en cpm (coups par minute) et représentent les valeurs moyennes \pm les déviations standard obtenues à partir de 4 expériences (Dumont *et al.* 2000).



Percent of *in vitro* proliferative life span

Fig I-10 : Effet des stress répétés au *t*-BHP sur la proportion des cellules positives pour l'activité SA-β-Galactosidase. Données provenant de fibroblastes ayant atteint 52 à 90 % de leur durée de vie proliférative (colonnes blanches) et de fibroblastes à 56 % de leur durée de vie proliférative soumis à 5 stress répétés de 1 h avec 30 μ M de *t*-BHP (colonne hachurée). Les valeurs représentées sont les proportions moyennes \pm les déviations standard obtenues à partir de 4 expériences (Dumont *et al.* 2000).

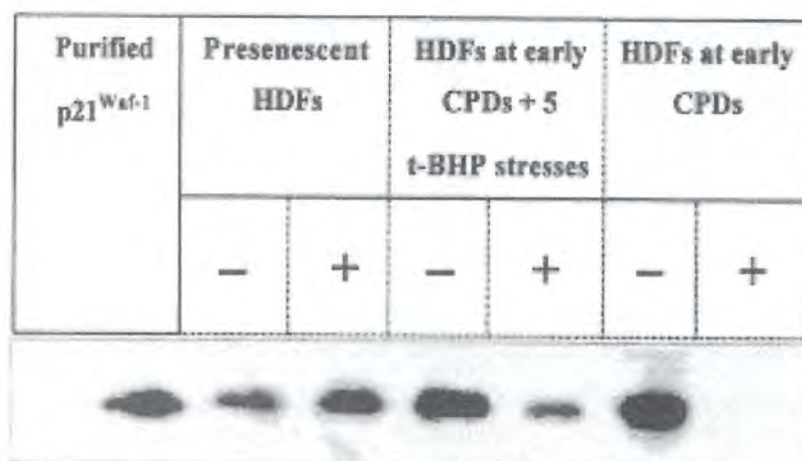


Fig I-11 : Analyse de l'expression de p21 waf-1 par Western blot. Les extraits cellulaires ont été préparés à partir de fibroblastes jeunes (early CPD), de fibroblastes âgés (presenescent), et de fibroblastes jeunes ayant subi 5 stress au *t*-BHP. Les fibroblastes stressés ont pu récupérer pendant 48h dans du milieu de culture +10% FBS. Ensuite les cellules furent incubées pendant 48 h dans un milieu sans sérum (donc sans facteurs de croissance) (milieu BME+0,5 % HLA).Après 21 h de stimulation avec du BME+10 % FBS,les cellules étaient fortifiées , et leurs protéines ont été extraites en vue du Western blot. Les résultats ci-dessus sont ceux obtenus après 48h de privation de sérum(-) et après la stimulation ultérieure avec 10 % FBS (+) (Dumont *et al.*2000).

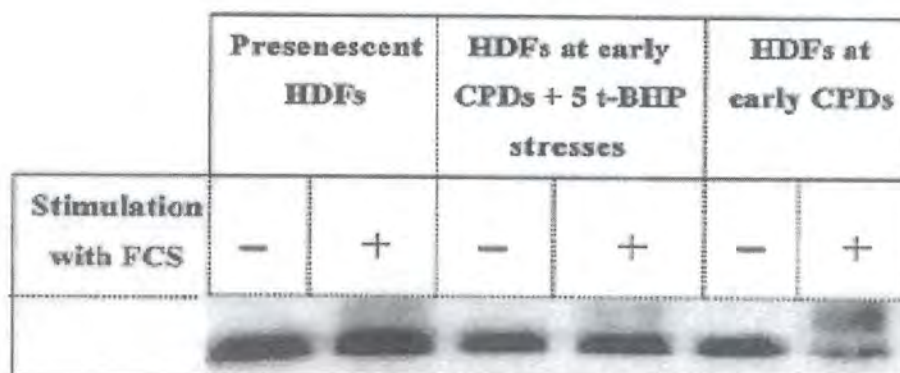


Fig I-12 : Analyse de la phosphorylation de pRb par Western blot. Les extraits cellulaires ont été préparés à partir de fibroblastes jeunes (early CPD), de fibroblastes âgés (presenescent), et de fibroblastes jeunes ayant subi 5 stress au *t*-BHP. Les fibroblastes stressés ont pu récupérer pendant 48h dans du milieu de culture +10% FBS .Ensuite les cellules furent incubées pendant 48 h dans un milieu sans sérum (donc sans facteurs de croissance) (milieu BME+0,5 % HLA).Après 21 h de stimulation avec du BME+10 % FBS,les cellules étaient fortifiées , et leurs protéines ont été extraites en vue du Western blot. Les résultats ci-dessus sont ceux obtenus après 48h de privation de sérum(-) et après la stimulation ultérieure avec 10 % FBS (+) (Dumont *et al.*2000).

2) Effets des stress subléthaux sur l'index mitotique et la prolifération cellulaire

On observe chez les fibroblastes entrant en SR une chute du potentiel prolifératif suivie d'un arrêt de croissance irréversible. P. Dumont a observé que le niveau d'incorporation de thymidine tritiée diminue dans les cellules traitées au *t*-BHP par rapport aux cellules contrôle aux mêmes CPD (doublements de population), et se rapproche plutôt du niveau d'incorporation des fibroblastes sénescents (à 95 % de leur durée de vie). (fig. I-9) (Dumont *et al*, 2000). La confluence est atteinte moins rapidement dans les cellules stressées au *t*-BHP.

3) Activité SA- β -Galactosidase

Le pourcentage de fibroblastes positifs pour l'activité SA- β -Galactosidase augmente avec le nombre de doublements de population. Les fibroblastes traités au *t*-BHP montrent, alors qu'ils sont à 56 % de leur durée de vie, une activité SA- β -Galactosidase semblable à celle des fibroblastes à 85 % de leur durée de vie (fig. I-10) (Dumont *et al*, 2000).

4) Expression de p21^{Waf-1/SDI-1/Cip1} et phosphorylation de pRb

Dans les fibroblastes sénescents on observe une surexpression de la CDKI p21^{Waf-1/SDI-1/Cip1} et une hypophosphorylation de pRb. Pour étudier ces biomarqueurs, P. Dumont, travaillant dans notre équipe, a comparé 3 situations :

- Des fibroblastes ayant subi peu de passages en culture (fibroblastes « jeunes »)
- Des fibroblastes ayant subi beaucoup de passages en culture (fibroblastes « vieux »)
- Des fibroblastes jeunes ayant subi 5 stress de 30 μ M avec du *t*-BHP

D'abord, notre équipe a déterminé, dans les 3 situations, le niveau d'expression de p21^{Waf-1/SDI-1/Cip1} et le niveau de phosphorylation de pRb après avoir privé les cellules de sérum. Il a été observé que p21^{Waf-1} est fortement surexprimé, et pRb hypophosphorylé, chez les FHD vieux et chez les FHD en SIPS.

Ensuite, du milieu frais a été donné aux cellules, avec 10 % de FBS (Fœtal Bovine Serum), afin qu'elles récupèrent. Notre équipe a constaté que :

- Chez les fibroblastes jeunes, le niveau d'expression de p21^{Waf-1} diminue tandis que la phosphorylation de pRb augmente.
- Chez les fibroblastes âgés, le niveau d'expression de p21^{Waf-1} reste élevé et pRb reste hypophosphorylé.
- Les fibroblastes jeunes stressés au *t*-BHP se comportent comme des fibroblastes âgés.

(fig. I-11 et I-12)

5) Expression des gènes dans la SR et 72 h après des stress subléthaux avec H₂O₂ ou *t*-BHP

Puisque les cellules stressées semblent se comporter comme des cellules sénescents, notre équipe a déterminé, chez des cellules jeunes stressées, le niveau d'expression d'une série de gènes dont on savait qu'ils étaient surexprimés en sénescence répllicative. En effet, Gonos *et al*. avaient trouvé 8 gènes surexprimés dans les fibroblastes sénescents d'embryon de rat et dans les ostéocytes trabéculaires humains sénescents.

P. Dumont et d'autres chercheurs de notre équipe ont analysé ces gènes par Northern blot chez des fibroblastes diploïdes humains WI-38 en SR. Ils ont constaté que le niveau d'ARNm de SM22, ostéonectine, apolipoprotéine J (Apo J), SS9, fibronectine, α 1(I)-procollagène, la sous-unité α des protéines de liaison au GTP et de la sous-unité 4 de la cytochrome *c* oxydase

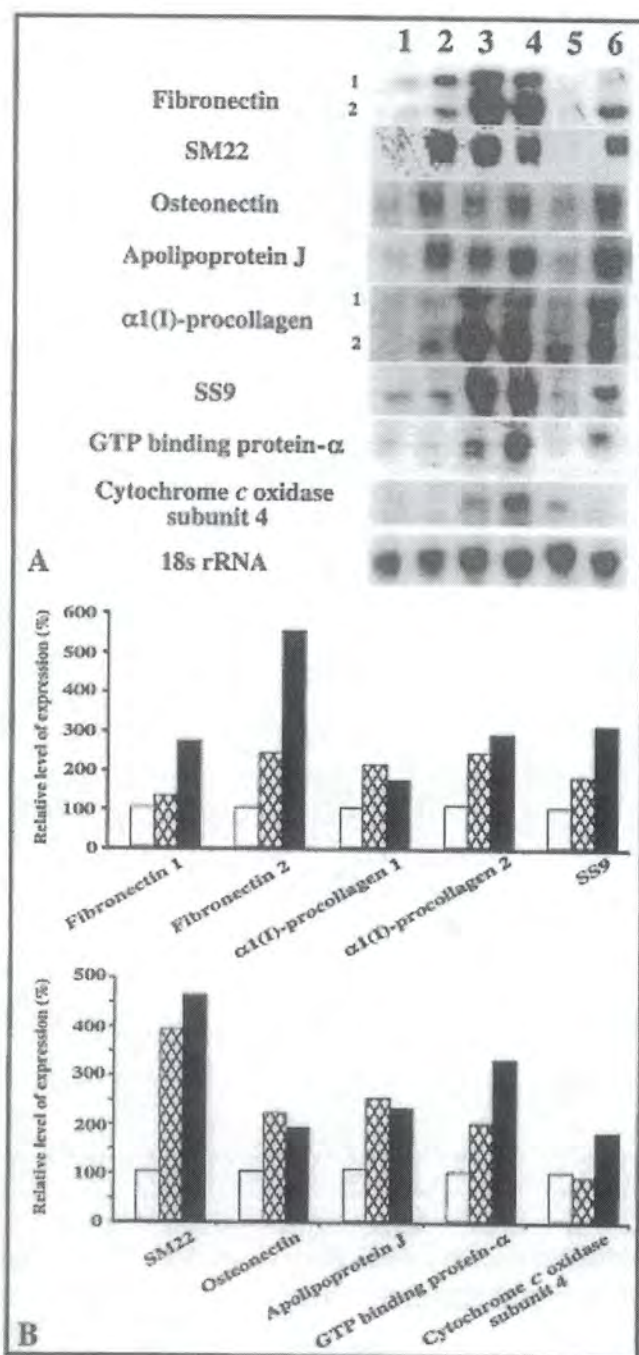


Fig I-13 : (A) Autoradiographies des analyses Northern blot réalisées sur des fibroblastes WI-38 non confluents à différents CPD (doublements de population)
 Colonne 1 : 25 CPD ; colonne 2 : 35 CPD ; colonne 3 : 45 CPD ; colonne 4 : 49 CPD
 Les colonnes suivantes montrent des fibroblastes jeunes ayant subi (colonne 6) ou non (colonne 5) 5 stress de 1h avec 30 μ M de *t*-BHP. L'expression de l'ARNr 18s ne varie pas avec la sénescence répliquative et a été utilisée comme référence après les stress oxydatifs.
 (B) Quantification des analyses Northern blot réalisées sur des fibroblastes WI-38 non confluents avec peu de CPD (colonnes blanches), beaucoup de CPD (colonnes noires) et fibroblastes jeunes soumis à 5 stress répétés de 1 h avec 30 μ M de *t*-BHP (colonnes hachurées). Le signal obtenu pour l'ARNr 18s a été utilisé pour normaliser les signaux obtenus pour les gènes d'intérêt. Le signal obtenu pour les fibroblastes jeunes non stressés peut être considéré comme 100 % de l'expression (Dumont *et al*, 2000).

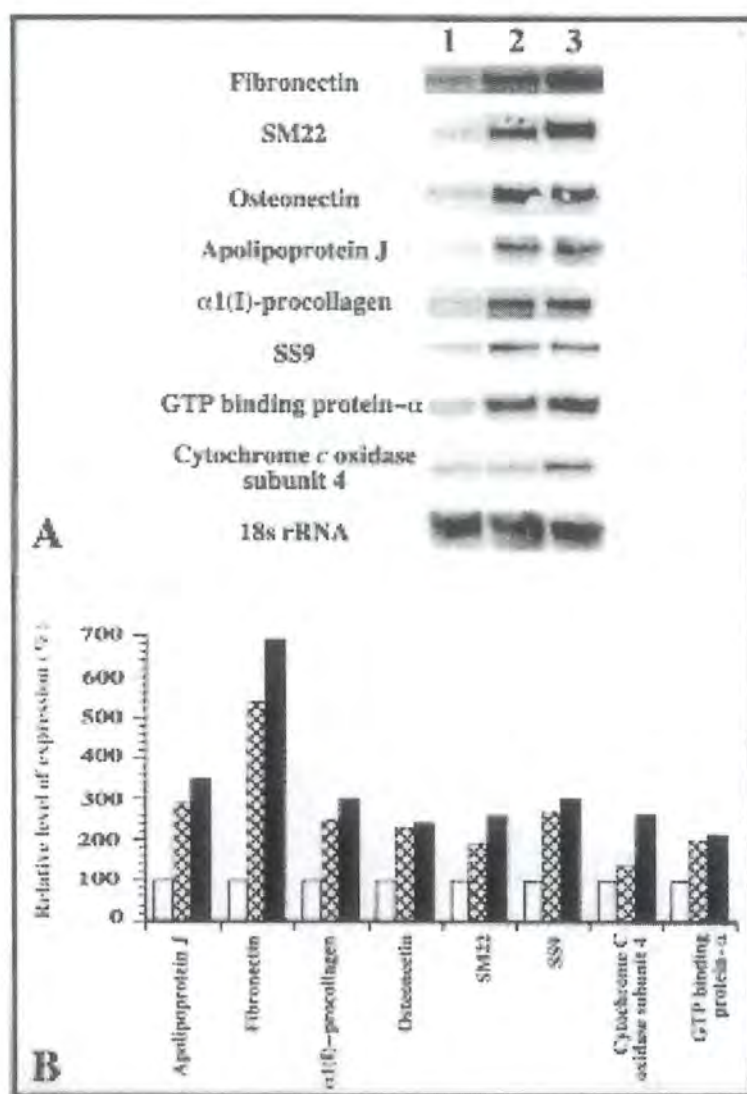


Fig I-14 : (A) Autoradiographies des analyses Northern blot réalisées sur des fibroblastes IMR-90 non confluents à différents CPD (doublements de population)

Colonne 1 : CPDs <25 -> cellules jeunes

Colonne 2 : cellules jeunes (CPDs <25) soumises à un stress unique de 2h avec 450 μ M de H₂O₂

Colonne 3 : CPDs >52 -> cellules âgées

L'expression de l'ARNr 18s ne varie pas avec la sénescence répliquative et a été utilisée comme référence après les stress oxydatifs.

(B) Quantification des analyses Northern blot réalisées sur des fibroblastes IMR-90 non confluents avec peu de CPD (colonnes blanches), beaucoup de CPD (colonnes noires) et fibroblastes jeunes soumis à 1 stress unique de 2h avec 450 μ M de H₂O₂ (colonnes hachurées). Le signal obtenu pour l'ARNr 18s a été utilisé pour normaliser les signaux obtenus pour les gènes d'intérêt. Le signal obtenu pour les fibroblastes jeunes non stressés peut être considéré comme 100 % de l'expression (Dumont *et al*, 2000).

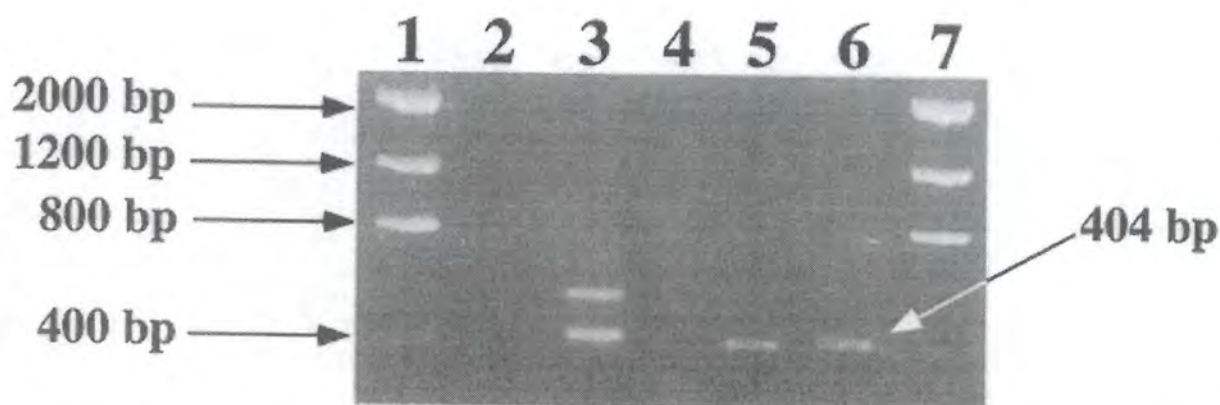


Fig I-15 : Détection de la délétion mitochondriale commune de 4977 bp par PCR emboîtée (Nested PCR).

Colonnes 1 et 7 : marqueur de poids moléculaire (Low DNA Mass Ladder)

Colonne 2 : fibroblastes WI-38 à 55 % de leur durée de vie proliférative

Colonne 3 : fibroblastes WI-38 à 55 % de leur durée de vie proliférative soumis à 5 stress répétés de 1 h avec 30 μ M de *t*-BHP

Colonne 4 : contrôle négatif (PCR réalisée sans ADN matrice)

Colonne 5 : fibroblastes WI-38 à 70 % de leur durée de vie proliférative

Colonne 6 : fibroblastes WI-38 à 95 % de leur durée de vie proliférative. La présence de la délétion mitochondriale commune de 4977 bp donne un produit de 404 bp indiqué par la flèche.

NB : Une seconde délétion apparaît sur la piste 3 (Dumont *et al*, 2000).

augmente chez les cellules à 100 % de leur durée de vie par rapport aux cellules jeunes (à 50% de leur durée de vie).

Une analyse similaire a été réalisée sur des fibroblastes WI-38 soumis à des stress oxydatifs répétés. Des fibroblastes WI-38 à 60% de leur durée de vie furent soumis à 5 stress subcytotoxiques avec 30 μ M de *t*-BHP. On a observé que les gènes surexprimés en SR étaient également surexprimés en SIPS, à l'exception de la sous-unité 4 de la cytochrome *c* oxydase et du long transcrit de la fibronectine (fig. I-13).

L'analyse de l'expression des gènes fut ensuite réalisée sur des fibroblastes IMR-90, 72 h après un stress unique de 2 h avec 450 μ M de H₂O₂. Les gènes surexprimés en SR étaient également surexprimés dans cette situation de SIPS, à l'exception de la sous-unité 4 de la cytochrome *c* oxydase (fig. I-14).

La fibronectine permet un meilleur ancrage des cellules à la matrice extracellulaire, donc augmente la résistance à l'apoptose lors de la SIPS. Elle est également impliquée dans organisation du cytosquelette, la médiation de signaux mitogéniques externes et la réparation de blessures. Elle est en partie responsable de l'augmentation de la surface cellulaire en sénescence répliquative (Dumont *et al*, 2000).

L'ostéonectine est responsable de l'arrêt de la division lors de la SIPS, en inhibant la réponse proliférative de la cellule à certains mitogènes. Il s'agit d'une protéine de liaison au calcium, capable d'inhiber l'entrée de la cellule en phase S (Fripiat *et al*, 2002) (Dumont *et al*, 2000). SM 22 intervient dans le changement de la morphologie cellulaire. Il code pour une protéine de liaison au calcium (Fripiat *et al*, 2002) (Dumont *et al* , 2000).

L'Apo J protège la cellule contre la SIPS : La surexpression d'Apo J diminue l'apparition de la morphologie sénescence et l'activité SA- β -gal, après des stress subcytotoxiques au *t*-BHP ou à l'éthanol (Dumont *et al*, 2002).

La sous-unité α des protéines de liaison au GTP est impliquée dans la régulation négative des voies de signalisation dépendant du calcium et des canaux calciques, supprimant les courants membranaires dépendants du calcium. Cela expliquerait pourquoi les cellules sénescences ne répondent plus aux stimulations exogènes dépendant du calcium.

6) La délétion de 4977 bp de l'ADN mitochondrial

Puisque cette délétion de l'ADN mitochondrial est un biomarqueur de la SR, il est intéressant de voir si elle survient également en SIPS. Grâce à la méthode de nested PCR, P.Dumont et son équipe ont démontré que cette délétion survient chez des fibroblastes WI-38 soumis à 5 stress répétés avec 30 μ M de *t*-BHP. De plus on observe dans cette situation une 2^{ème} délétion, de 4838 pb (fig. I-15).

7) Stress à l'éthanol

L'éthanol peut également être utilisé comme molécule stressante afin d'induire la SIPS.

Lorsque les cellules sont stressées à l'éthanol, leurs membranes biologiques sont déstabilisées et leur fluidité est modifiée. (Brazeau *et al*, 1990)

Il existe actuellement un modèle de SIPS avec 5 stress répétés de 2 h, utilisant comme dose subcytotoxique 5% d'éthanol (v/v). Les mêmes marqueurs que précédemment (morphologie sénescence, activité β -galactosidase associée à la sénescence, etc.) sont observés dans ce modèle.

Comme expliqué ci-dessus, un modèle de SIPS à 5 stress répétés, avec du *t*-BHP ou de l'éthanol, a été mis au point dans notre laboratoire.

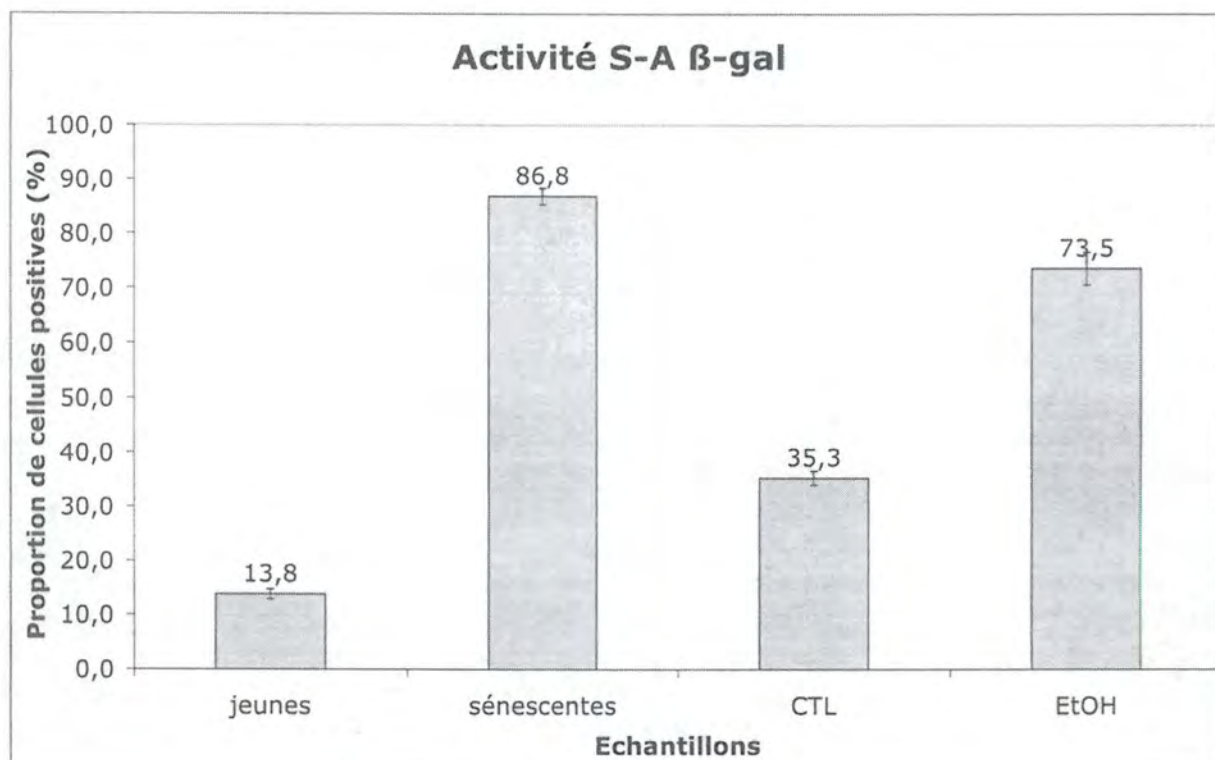


Fig I-16 : Activité SA- β -galactosidase de FHD WI-38 jeunes (CPD 29) et en sénescence répliquative (CPD 46), et de FHD WI-38 soumis ou non (CTL) à 5 stress répétés avec 5% d'éthanol.

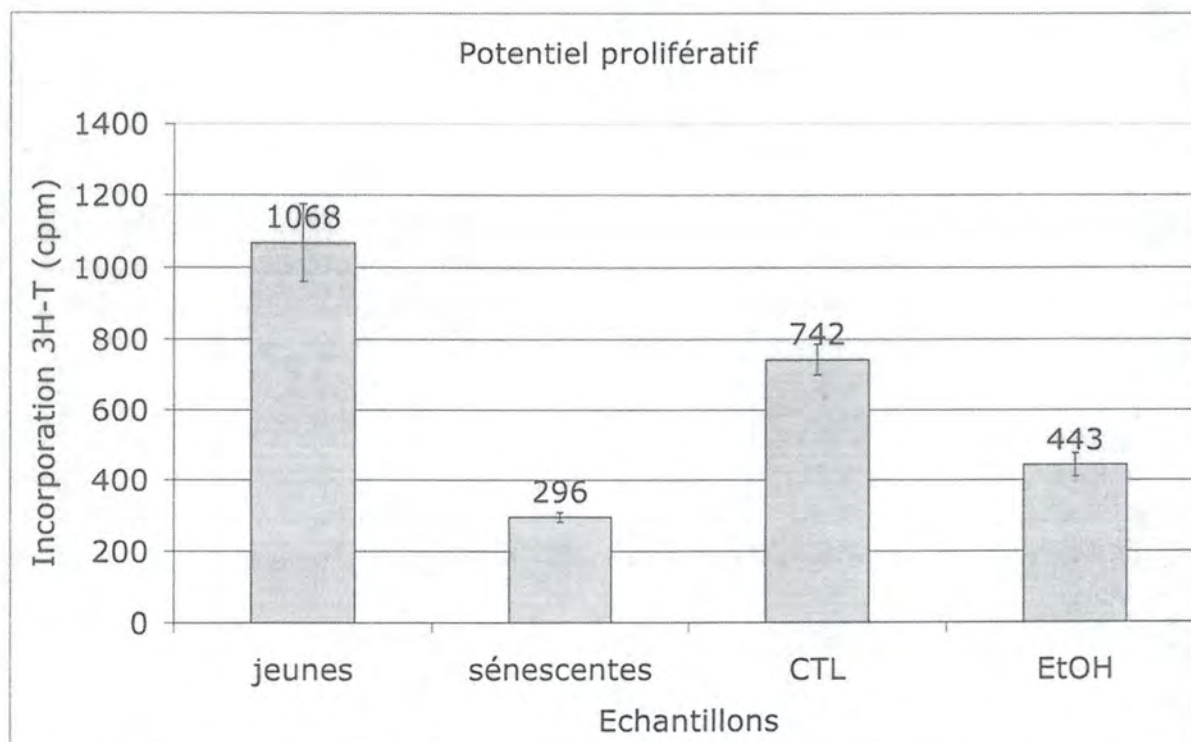


Fig I-17 : Potentiel prolifératif de FHD WI-38 jeunes (CPD 29) et en sénescence répliquative (CPD 46), et de FHD WI-38 soumis ou non (CTL) à 5 stress répétés avec 5% d'éthanol

Differential display

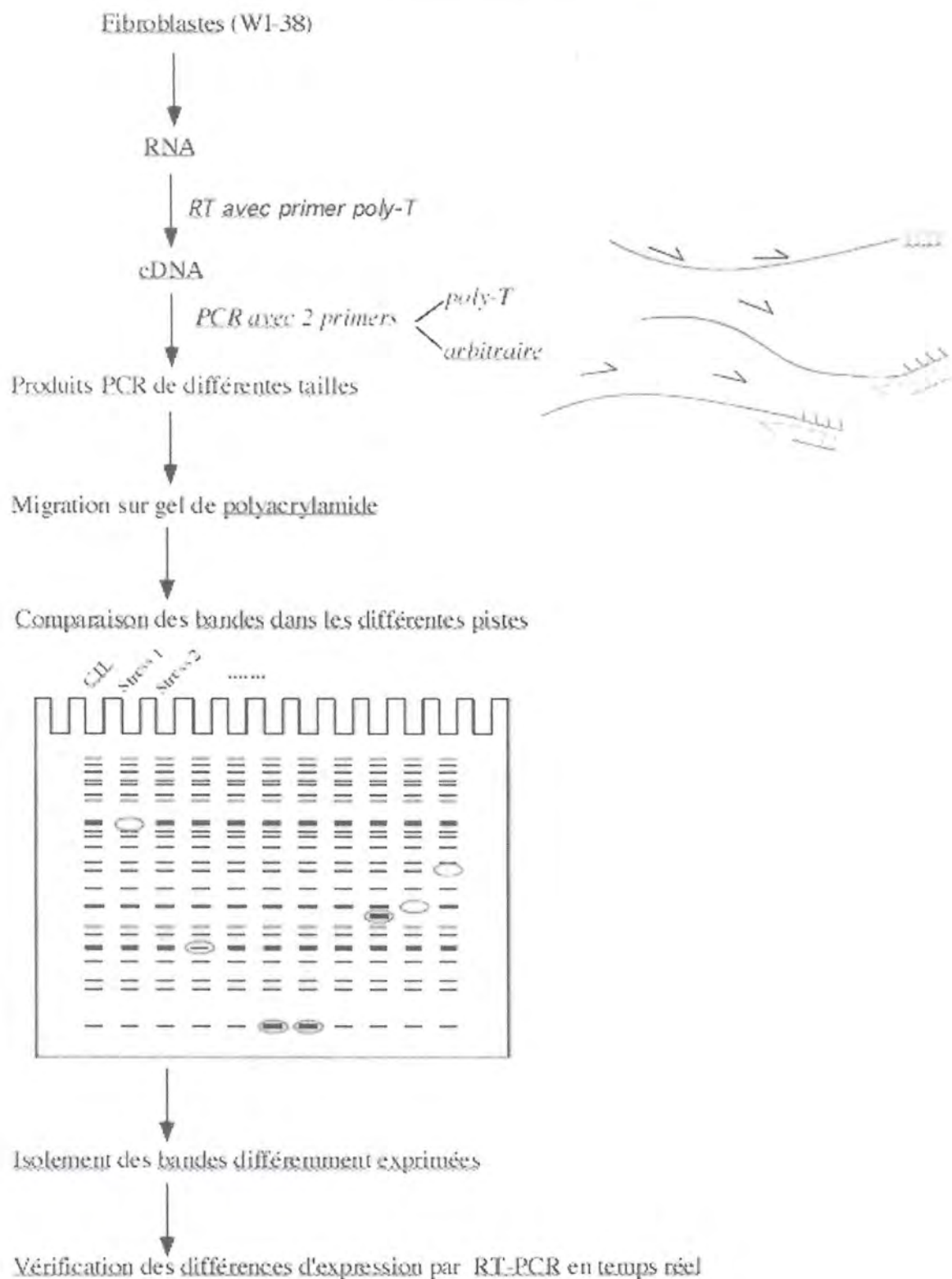


Fig I-18.: Représentation schématique des différentes étapes du Differential Display

Sénescentes / CTL
147 variations

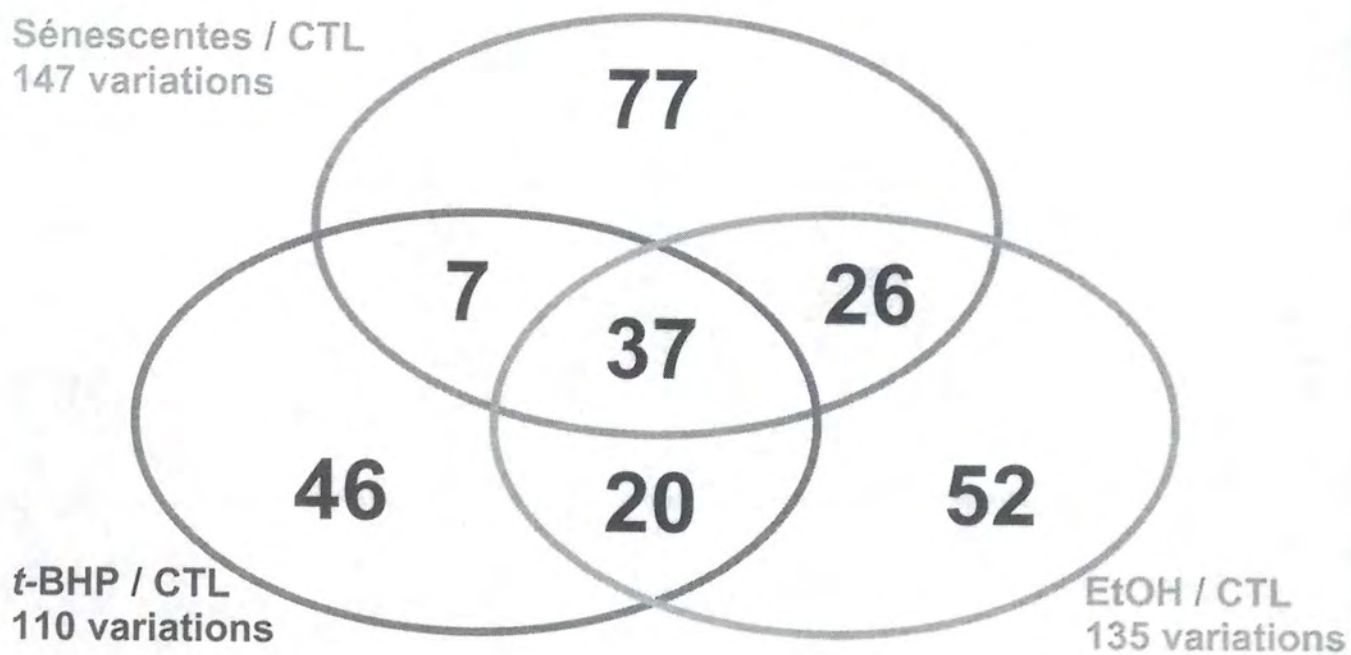


Fig I-19 :Résultats de l'étude transcriptomique de la SIPS et la SR

Si on regarde les résultats obtenus après 5 stress répétés avec 5% d'éthanol sur des WI-38 (fig. I-16 et I-17), on voit que l'activité SA- β -gal augmente de manière hautement significative par rapport au contrôle, dans les cellules sénescents et stressées à l'éthanol. Le potentiel prolifératif diminue pour les cellules stressées à l'éthanol ainsi que pour les cellules sénescents, par rapport aux cellules des puits Jour 0 et contrôles.

8) *Études fonctionnelles de gènes*

Une étude transcriptomique a été réalisée au sein de notre laboratoire, par la technique de Differential Display (fig. I-18), afin de mettre en évidence des modifications de l'expression de certains gènes au cours de la SIPS et de la SR (fig. I-19). On observe que certaines modifications d'expression sont communes aux deux situations, tandis que d'autres sont spécifiques à l'une ou l'autre situation.

9) But du travail :

Des fibroblastes humains diploïdes jeunes de la souche WI-38 exposés à 5 stress subcytotoxiques répétés quotidiennement au *tert*-butyl hydroperoxyde (*t*-BHP) ou à l'éthanol présentent, deux à trois jours après le dernier stress, des biomarqueurs caractéristiques de cellules en Sénescence Répliquative (SR) (ex : activité S-A β -gal, arrêt de prolifération, surexpression de certains gènes comme l'apolipoprotéine J, la fibronectine, l'ostéonectine, etc.). Ce phénomène est appelé la Sénescence Induite Prématurément par les Stress (SIPS).

Une étude visant à comparer les transcriptomes de fibroblastes en SIPS et en SR a été menée au laboratoire. Il en ressort qu'il existe des modifications de l'expression de certains gènes qui sont communes à ces deux phénomènes, mais que d'autres modifications d'expression sont propres à l'une ou l'autre situation.

Sur base de ces données, une étude fonctionnelle est envisagée en surexprimant certains gènes afin de déterminer leur implication éventuelle dans l'apparition ou la maintenance du phénotype sénescence, ou de mettre en évidence une protection éventuelle contre les stress ou la SIPS.

Le but de notre travail est d'arriver à résoudre deux problèmes liés au modèle de SIPS à 5 stress sur des fibroblastes de la souche WI-38, qui doivent impérativement être contournés pour mener à bien cette étude fonctionnelle :

Le premier est lié à la longueur dans le temps, 8 jours entre le premier stress et l'analyse du phénotype, du modèle de SIPS à 5 stress. Cette durée est incompatible avec, par exemple, une transfection transitoire d'un gène pour laquelle l'expression ectopique chute après environ 3 jours. Pour ce faire, nous voulons développer un modèle de SIPS à stress unique au *t*-BHP et à l'éthanol sur des fibroblastes WI-38.

Le second problème est lié à l'étude de la surexpression d'un gène chez des fibroblastes WI-38. Etant donné que ces cellules vieillissent au cours des divisions cellulaires, la stratégie de surexpression stable, qui nécessite un processus de sélection relativement long des cellules ayant intégré le transgène est difficilement réalisable dans la perspective de l'étude de la SIPS. En effet, à la fin de la sélection et de l'amplification des cellules surexprimant le gène d'intérêt, les fibroblastes WI-38 sont relativement proches de la SR et présentent donc déjà des biomarqueurs de la sénescence. Ce problème peut être contourné en utilisant une lignée de fibroblastes WI-38 qui ont été immortalisés par la surexpression de la sous-unité catalytique de la télomérase (h-TERT). Des études préalables ont montré que ces cellules étaient capables d'entrer en SIPS suite à un stress à l' H_2O_2 . Nous allons donc essayer d'induire la SIPS chez cette lignée avec des stress au *t*-BHP et à l'éthanol.

Matériel
et
Méthodes

II :Matériel et méthodes

1)Repiquage des cellules

Matériel :

- Cellules :
 - FHD WI-38
 - FHD WI-38/h-TERT :FHD WI-38 immortalisés avec la sous-unité catalytique de la télomérase (h-TERT)
- Milieu de culture
 - Pour FHD WI-38 : BME +10% FBS (Invitrogen, Paisley, Grande-Bretagne)
 - Pour FHD WI-38/h-TERT : MEM +10 % FBS (Invitrogen, Paisley, Grande-Bretagne) +MEM non essential amino acids (Invitrogen, Paisley, Grande-Bretagne) + Pyruvate (Sigma, St Louis, USA)
- Milieu de rinçage : PBS (Phosphate Buffer Saline) : tampon Phosphate 10 mM, pH 7.4 + NaCl 0.9 %
- Trypsine (Invitrogen, Paisley, Grande-Bretagne) (pour les fibroblastes WI-38)
- Trypsine +EDTA (Invitrogen, Paisley, Grande-Bretagne) (pour les fibroblastes WI-38/h-TERT)
- Boîtes de culture :
 - T75 (75 cm²/boîte) (Corning, NY, USA) (doivent contenir 15 ml de milieu de culture)
 - Plaques multi-puits (6 puits) (9,40 cm²/puits) (Corning, NY, USA) (lors de mes expériences j'ai mis 2ml/puits)

Méthode :

Les cellules sont maintenues en culture à 37 °C selon la méthode classique décrite par Hayflick& Moorhead (Hayflick L. & Moorhead P.S .,1961)

Elles doivent être repiquées quand elles sont à confluence, dans des conditions stériles. Tout d'abord elles sont rincées 2 fois avec du PBS, afin d'enlever toute trace de sérum. En effet celui-ci inhibe l'action de la trypsine. Puis, 1 ml de trypsine est ajouté (pour cellulesWI-38) ou 1 ml de trypsine+EDTA (pour les WI38 h-TERT) et les cellules sont incubées 5 à 10 min à 37°C (ou pendant 2 à 3 minutes s'il s'agit de trypsine+EDTA). Lorsque les cellules se détachent bien de la boîte, elles sont resuspendues dans le milieu de culture *ad hoc*, supplémenté avec 10% de FBS. La suspension cellulaire est alors répartie dans 2 ou 4 nouvelles boîtes de culture pour l'amplification de la culture.

Le nombre de cellules en suspension peut également être déterminé par comptage d'un échantillon de la suspension cellulaire au moyen d'une chambre de Neubauer. Ceci permet d'ensemencer des puits avec un nombre déterminé de cellules pour réaliser les manipulations.

NB : Les fibroblastes WI-38 étant cultivés dans du BME (milieu tamponné avec du carbonate), ils doivent être cultivés dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

2) Stress au *t*-BHP et à l'éthanol

- Repiquage de cellules pour la préparation d'un stress

Cfr point 1.

En plus des cellules destinées à être stressées, il faut également prévoir des cellules contrôle (Jour 0 et contrôle). Les cellules « Jour 0 » témoignent de l'état des cellules avant les stress. Les cellules contrôles subissent les mêmes conditions de culture que les cellules stressées, sauf qu'elles ne sont jamais mises en présence de molécules stressantes.

Dans des plaques de 6 puits, on repique les cellules 24 h avant le stress, à raison de 200 000 cellules / puits pour les WI-38 et les WI-38/h-TERT .

2.a) Stress au *t*-BHP

Matériel :

Souches cellulaires et milieux de culture : cfr point 1.

t-BHP (*tert*-butylhydroperoxide) (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Méthodes :

Le *t*-BHP commercialisé par Merck est à la concentration de 8M. Il est dilué dans du milieu de culture pour obtenir le « milieu de stress » à la concentration appropriée.

Dans chaque puits, le milieu de culture est remplacé par du milieu de stress à la concentration appropriée. Il faut ensuite mettre la plaque de culture à 37°C dans l'étuve contenant 5% de CO₂ pendant 2h .

Après deux heures, le stress est arrêté en enlevant le milieu de stress, et en rinçant chaque puits avec 2 ml de PBS, puis en mettant 2 ml de milieu de culture par puits. Les cellules resteront à l'étuve jusqu'au lendemain.

Les cellules appelées « Jour 0 » ne sont pas stressées, mais lysées le jour du stress, ce qui reflète l'état initial de la culture.

2.b) Stress à l'éthanol

Matériel :

Souches cellulaires et milieux de culture : FHD WI-38 et WI-38/h-TERT , et les milieux qui leur sont associés : cfr point 1.

Ethanol absolu (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Méthode :

Le protocole est semblable à celui des stress au *t*-BHP. Le stress dure également 2 h.

3) Détermination de la viabilité cellulaire par la méthode du MTT

Principe :

Les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT et le clivent en son dérivé formazan qui se présente sous la forme de cristaux mauves visibles à l'œil nu et insolubles en milieu aqueux. Cette réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale, la succinate deshydrogénase. Une corrélation peut être établie entre l'absorbance à 570nm (qui reflète la quantité de MTT réduit) et le nombre de cellules vivantes.

Matériel :

Solution MTT : MTT (bromure de 3,(4,5-diméthyl-thiazol-2-yl) diphényltétrazolium) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) préparé à une concentration de 2,5 mg/ml dans du PBS.

Solution de lyse : préparée à partir de 2 volumes de SDS 30% et chauffé à 37°C et d'1 volume de N, N -diméthyl-formamide (Janssen Chimica, Belgique). Le pH de la solution est ensuite ajusté à 4,7 à l'aide d'une solution acide (ac.acétique 80 % : HCl 1 N / 9 :1)

Méthode :

A 24 h après le stress, les cellules sont incubées avec 2 ml de solution MTT pendant 2h à 37°C. Le milieu est ensuite retiré et remplacé par 2ml de solution de lyse. La plaque est incubée à 37°C sur un agitateur (110 tours/minute) afin de dissoudre les cristaux de MTT. L'absorbance de la solution est ensuite mesurée à 570 nm.

4) Détection de l'activité SA- β -Galactosidase

Matériel

Formaldéhyde 40 % (Belgolabo, Overijse, Belgique)
Glutaraldéhyde 50 % (Fluka, Buchs, Pays-Bas)
NaCl (Merck, Darmstadt, Allemangne)
NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Allemangne)
Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Allemangne)
Ferrocyanure de potassium (Merck, Darmstadt, Allemangne)
Ferricyanure de potassium (Merck, Darmstadt, Allemangne)
MgCl₂ (Merck, Darmstadt, Allemangne)
X-gal (Eurogentec, Seraing, Belgique)
N,N, diméthylformamide (Janssen Chimica, Geel, Belgique)

La solution de fixation est constituée de 2 % formaldéhyde et de 0,2 % glutaraldéhyde dilués dans du PBS.

La solution de coloration est constituée de 4 ml de tampon phosphate (pH 6) ; 1ml de ferrocyanure de potassium 0,1M ; 1ml de ferricyanure de potassium 0,1M ; 1,2 ml de NaCl 2,5M ; 40 μ l de MgCl₂ 1M ; 11,76 ml d'eau distillée et 1 ml d'une solution X-gal (20mg/ml dilué dans du N,N, diméthylformamide). Ces quantités sont valables pour préparer 20 ml de solution.

Méthode

Les cellules sont repiquées à faible densité dans des plaques multi-puits (6 puits) (100 000 cellules par puits).

Le milieu de culture est décanté, puis les cellules sont rincées 2 fois avec 2ml de PBS. Elles sont fixées dans la solution de fixation pendant 5 min. Ensuite elles sont de nouveau rincées 2 fois avec 2ml de PBS. Puis on ajoute la solution de coloration (2ml par puits). Les cellules sont incubées pendant 12 à 16h à 37°C et à l'abri de la lumière.

Le lendemain, quand la coloration est nette, les cellules sont lavées 2 fois au PBS. Ensuite les cellules sont comptées (environ 400 cellules par puits). On compte les cellules totales et les cellules colorées en bleu, afin de pouvoir calculer le pourcentage de cellules positives pour l'activité SA- β -Gal.

5) Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée

Matériel:

FDH WI-38

NaOH 0,5 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)

HCl 0,5 M (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Acide trichloroacétique (TCA) 10% (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Trypsine 0,25 % (Invitrogen, Paisley, Grande-Bretagne)

BME (Invitrogen, Paisley, Grande-Bretagne)

FBS (Invitrogen, Paisley, Grande-Bretagne)

Thymidine tritiée (Thymidine [methyl- ^3H], 2 Ci/mM) (NEN, Boston, USA)

Méthode:

La thymidine tritiée est diluée dans du milieu de culture à raison de 1 $\mu\text{Ci/ml}$.

Les cellules sont repiquées à 200 000 cellules /puits dans des plaques à 6 puits, 24 h avant le stress. Le lendemain du stress (ou le jour du stress pour les cellules Jour 0), l'ancien milieu est enlevé et remplacé par du milieu avec de la thymidine tritiée. Les boîtes sont ensuite incubées 24 h dans l'étuve à 5% de CO_2 , afin de permettre l'incorporation de la thymidine tritiée. Puis, les boîtes sont rincées 2 fois avec 1 ml de PBS, une fois avec 1 ml de TCA 10 %, une fois à l'éthanol et une fois au PBS.

On ajoute ensuite aux cellules 500 μl de NaOH et on laisse incuber 30 min, après quoi la réaction est neutralisée au moyen de 500 μl d'HCl 0,5 M. La solution est homogénéisée, puis l'homogénat est placé dans une fiole et on y ajoute 5 ml d'Aqualuma. Les fioles sont ensuite placées dans le compteur à scintillation, afin de déterminer la quantité de thymidine tritiée incorporée par les cellules dans chaque puits (cpm).

6) Analyse statistique des résultats

Les résultats présentés dans ce mémoire représentent la moyenne \pm un écart-type pour 3 réplicats. Les différences statistiquement significatives ont été calculées par un test de Student et annotées par * pour $p < 0,05$ (différence significative), ou ** pour $p < 0,01$ (différence hautement significative).

Résultats et Discussion

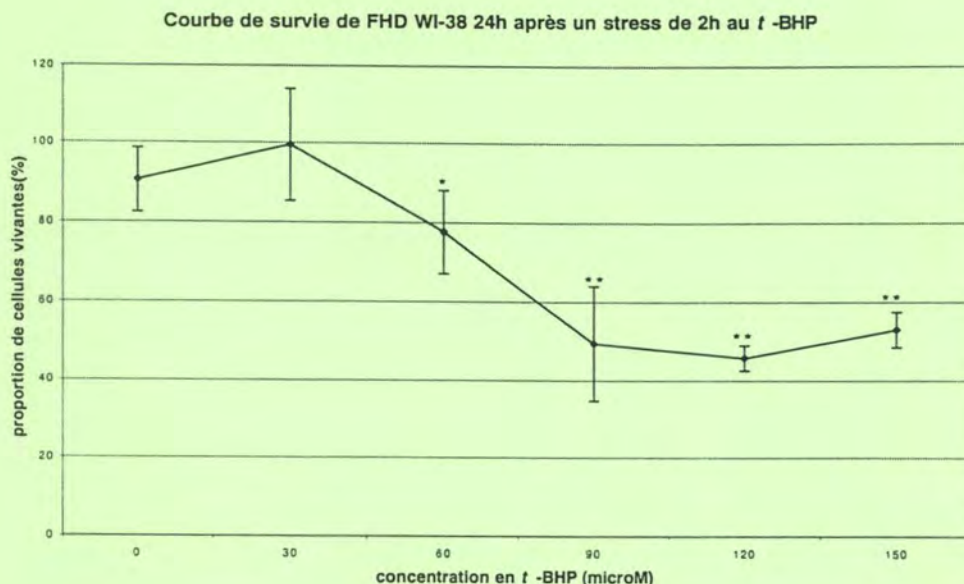


Fig III-1 : Courbe représentant la survie cellulaire 24h après un stress unique de 2 h avec des concentrations croissantes de *t*-BHP sur des FHD WI-38 . Les 100% représentent le nombre de cellules vivantes présentes au moment du stress (échantillons Jour 0) (Valeur de D.O. (à $\lambda=570$ nm) = $0,092 \pm 0,008$)

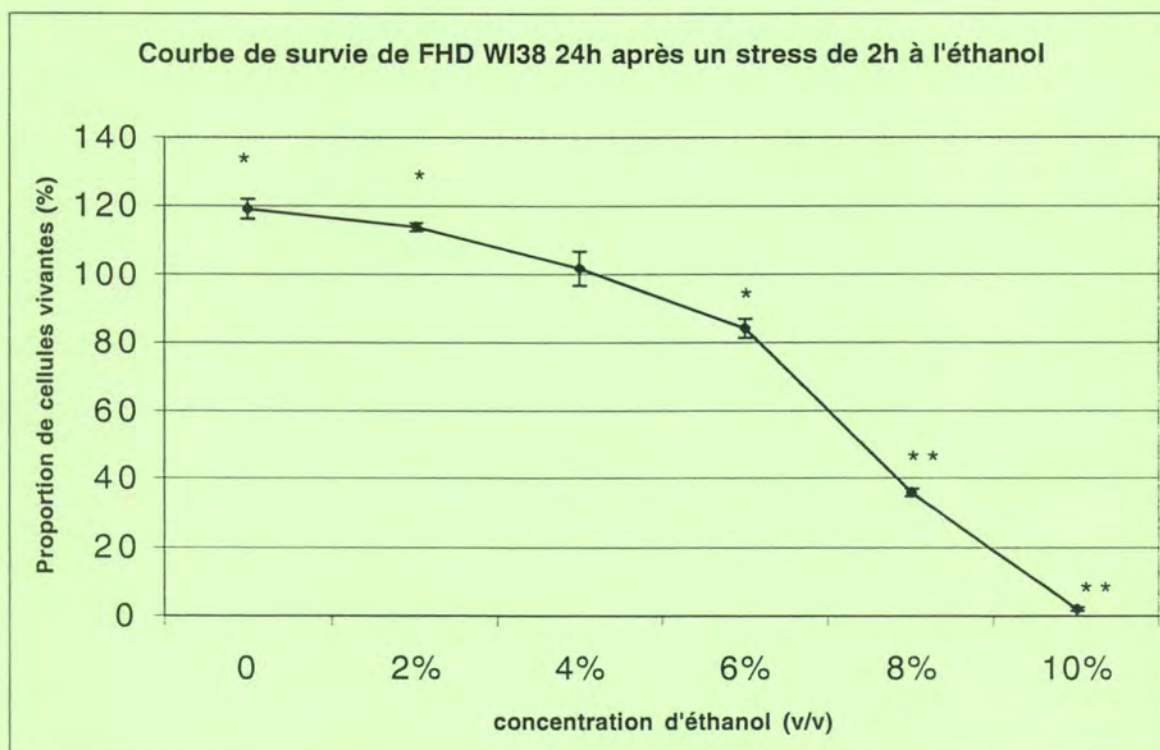


Fig III-2 : Courbe représentant la survie cellulaire 24h après un stress unique de 2 h avec des concentrations croissantes d'éthanol sur des FHD WI-38 . Les 100% représentent le nombre de cellules vivantes présentes au moment du stress (échantillons Jour 0) (Valeur de D.O. (à $\lambda=570$ nm) = $0,178 \pm 0,008$)

III :Résultats et discussion

1. Mise au point d'un modèle de SIPS à stress unique sur des FHD WI-38

La première partie de notre travail a été consacrée au développement d'un modèle de SIPS à stress unique au *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP), puis à l'éthanol sur des fibroblastes de la souche WI-38.

I-a) Détermination de la dose subcytotoxique d'agent stressant

La mise au point d'un modèle de SIPS nécessite au préalable de déterminer la dose subcytotoxique d'agent stressant, c'est-à-dire la concentration de *t*-BHP ou d'éthanol qui ne tue pas de cellules. Pour ce faire, les cellules sont incubées durant 2 heures avec des concentrations croissantes d'agents stressants. 24 heures après ce stress, la viabilité des cellules est déterminée par un test MTT.

- Stress au *t*-BHP (Fig. III-1)

Résultats

La concentration de *t*-BHP à partir de laquelle nous commençons à observer une différence significative de la proportion de cellules vivantes par rapport au nombre de cellules présentes en début de stress est de 60 μ M.

Discussion

Dans cette expérience, la concentration subcytotoxique de *t*-BHP, c'est-à-dire celle pour laquelle on n'observe pas de mortalité cellulaire est de 30 μ M. A une concentration de 60 μ M de *t*-BHP, le nombre de cellules vivantes diminue de 22.4% \pm 10.5 , cette proportion augmente pour les concentrations plus élevées en *t*-BHP.

- Stress à l'éthanol (Fig. III-2)

Résultats

La concentration d'éthanol à partir de laquelle nous commençons à observer une différence significative de la proportion de cellules vivantes par rapport au nombre de cellules présentes en début de stress est de 6 %.

Discussion

Dans cette expérience, la concentration subcytotoxique d'éthanol, c'est-à-dire celle pour laquelle on n'observe pas de mortalité cellulaire est de 4 %. À une concentration de 6 % d'éthanol, le nombre de cellules vivantes diminue de 15.7% \pm 2.8. Aux concentrations de 8 % et 10 %, l'éthanol est très toxique puisqu'il tue une large majorité des cellules.

En conclusion, les concentrations subcytotoxiques déterminées 24 h après un stress de 2 heures sur des FHD WI-38 sont de 30 μ M de *t*-BHP et de 4 % d'éthanol.

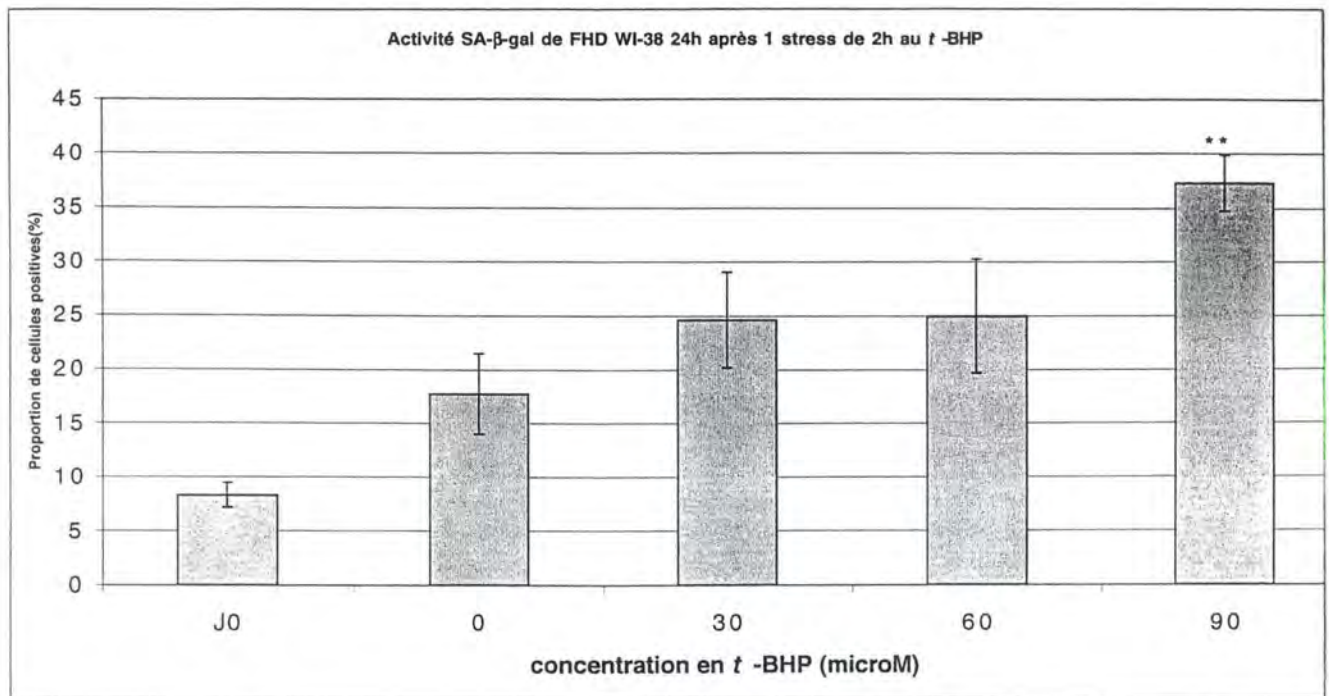


Fig III-3 : Proportion de cellules positives pour l'activité SA- β -Galactosidase 24h après un stress unique de 2 h avec des concentrations croissantes de *t*-BHP sur des FHD WI-38

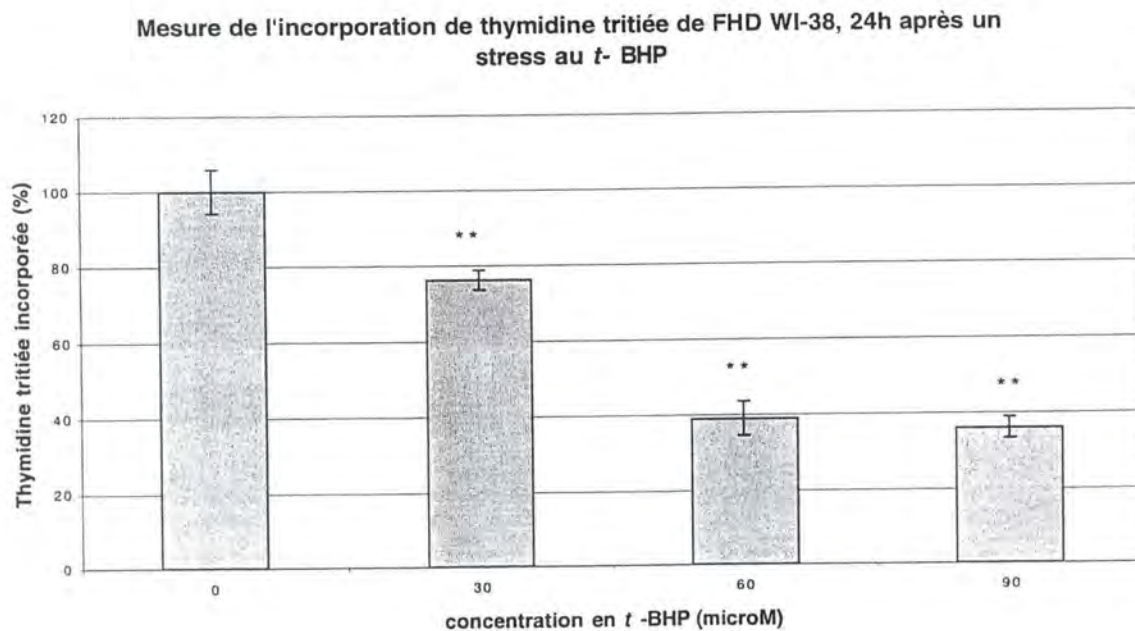


Fig III-4 Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée 24h après un stress unique de 2 h avec des concentrations croissantes de *t*-BHP sur des FHD WI-38 . (Le contrôle est considéré comme étant 100% et a une valeur de 348787,3 cpm \pm 20371)

I-b) Détermination de la dose d'agent stressant nécessaire pour induire la SIPS

L'étape suivante du travail consiste à déterminer la dose d'agent stressant nécessaire pour induire la SIPS des FHD WI-38. Pour ce faire, nous avons utilisé des concentrations de *t*-BHP et d'éthanol égales et supérieures aux doses subcytotoxiques. Nous avons déterminé l'entrée des cellules en SIPS d'une part en déterminant la proportion de cellules positives pour l'activité SA- β -galactosidase et d'autre part en estimant le potentiel prolifératif des cellules en mesurant leur incorporation de thymidine tritiée.

- Stress au *t*-BHP :

** Cellules positives pour l'activité SA- β -gal (Fig. III-3)*

Résultats

Nous observons que les concentrations de 30 μ M et 60 μ M de *t*-BHP n'entraînent pas d'augmentation significative de la proportion de FHD WI-38 positives pour l'activité S.A.- β galactosidase. Ce n'est qu'à partir d'une concentration de *t*-BHP de 90 μ M que nous observons une augmentation hautement significative de cette proportion. (37,3% \pm 2,6 contre 17,7% \pm 3,7 pour le contrôle).

Discussion

L'activité SA- β -gal n'est induite qu'à partir d'une concentration de 90 μ M de *t*-BHP, ce qui correspond à une dose trois fois supérieure à la dose subcytotoxique de *t*-BHP.

** Détermination du potentiel prolifératif (Fig. III-4)*

Résultats

On observe déjà une diminution significative, de 23.7% \pm 2.6 , de l'incorporation de la thymidine tritiée pour les FHD WI-38 traités avec 30 μ M de *t*-BHP par rapport aux cellules contrôle.

Discussion

Le nombre de cellules incorporant la thymidine tritiée reflète le potentiel prolifératif de la culture. On observe une chute du potentiel prolifératif des FHD WI-38 pour toutes les concentrations étudiées de *t*-BHP. Cette inhibition de prolifération est dose dépendante, elle est de plus de 60% par rapport au contrôle pour les cellules stressées avec une concentration de 90 μ M de *t*-BHP.

Activité SA- β -Gal de WI-38, 24h après un stress de 2h à l'éthanol

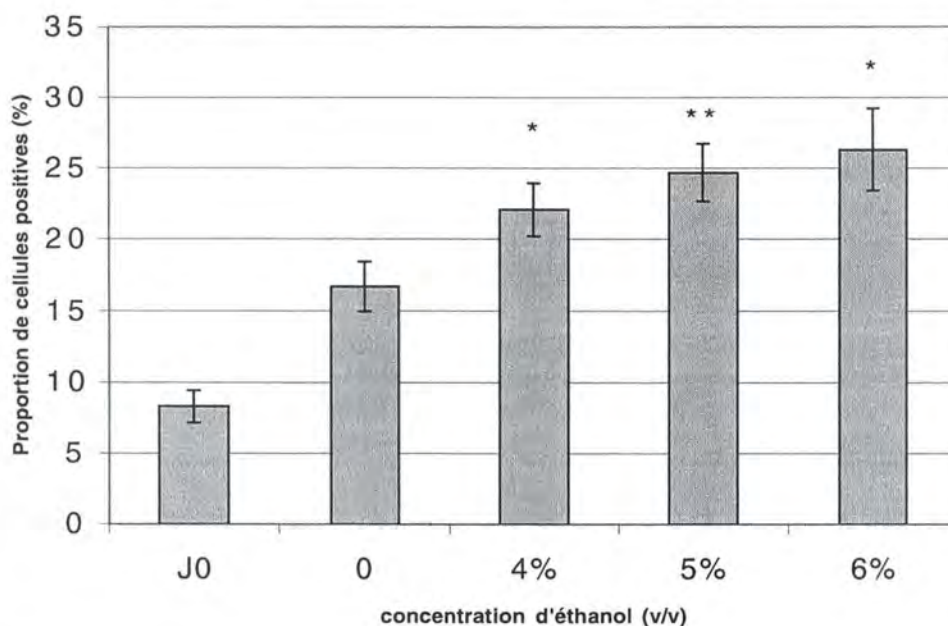


fig III-5 : Proportion de cellules positives pour l'activité SA- β -Galactosidase 24h après un stress unique de 2 h avec des concentrations croissantes d'éthanol sur des FHD WI-38 .

incorporation de thymidine tritiée 24h après un stress à l'éthanol sur WI38

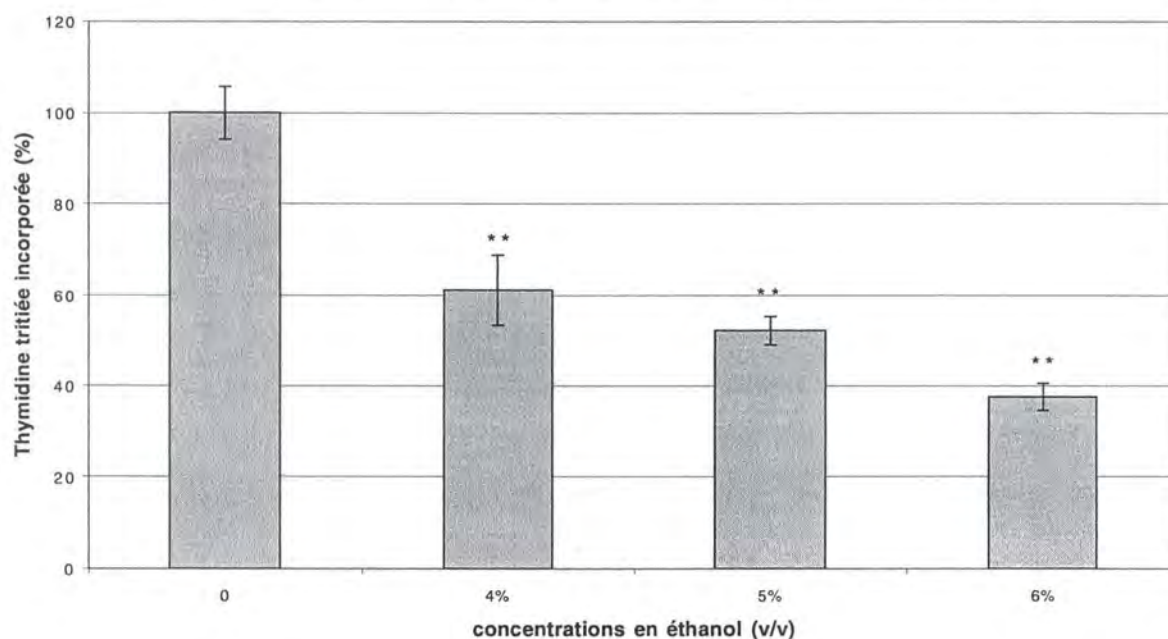


fig III-6 : Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée 24h après un stress unique de 2 h avec des concentrations croissantes d'éthanol sur des FHD WI-38 . (Le contrôle est considéré comme étant 100% et a une valeur de 348787,3 cpm \pm 20371)

- Stress à l'éthanol :

** Cellules positives pour l'activité SA- β -gal (Fig. III-5)*

Résultats

On observe que la proportion de FHD WI-38 positifs pour l'activité SA- β -gal augmente déjà de manière significative pour les cellules traitées avec 4% d'éthanol (une augmentation de $5.4\% \pm 1.9$), cette augmentation est hautement significative pour les cellules stressées avec des concentrations de 5 % et 6 % d'éthanol (une augmentation de, respectivement, $8\% \pm 2$ et $9.6\% \pm 2.9$).

Discussion

L'activité SA- β -gal est déjà induite à la concentration subcytotoxique de 4 % d'éthanol chez les FHD WI-38. Cette augmentation est plus importante chez les cellules stressées avec des concentrations supérieures en éthanol.

** Détermination du potentiel prolifératif (Fig. III-6)*

Résultats

On observe déjà une diminution significative, de $38.8\% \pm 7.8$, de l'incorporation de la thymidine tritiée pour les FHD WI-38 traités avec une concentration de 4 % d'éthanol par rapport aux cellules contrôle.

Discussion

Le nombre de cellules incorporant la thymidine tritiée reflète le potentiel prolifératif de la culture. On observe une chute du potentiel prolifératif des FHD WI-38 pour toutes les concentrations étudiées d'éthanol. Cette inhibition de prolifération est dose dépendante, elle est de $62.5\% \pm 2.9$ par rapport au contrôle pour les cellules stressées avec une concentration de 6 % d'éthanol.

I-c) Conclusion

Nous observons que les concentrations subcytotoxiques déterminées 24 h après un stress de 2 heures sur des FHD WI-38 sont de 30 μ M de t-BHP et de 4 % d'éthanol.

Les expériences de détermination de l'activité SA- β -gal et du potentiel prolifératif des cellules montrent que la dose d'agent stressant nécessaire pour induire la SIPS est supérieure à la dose subcytotoxique.

Survie cellulaire de FHD WI-38/h-TERT, 24h après un stress de 2h au *t*-BHP

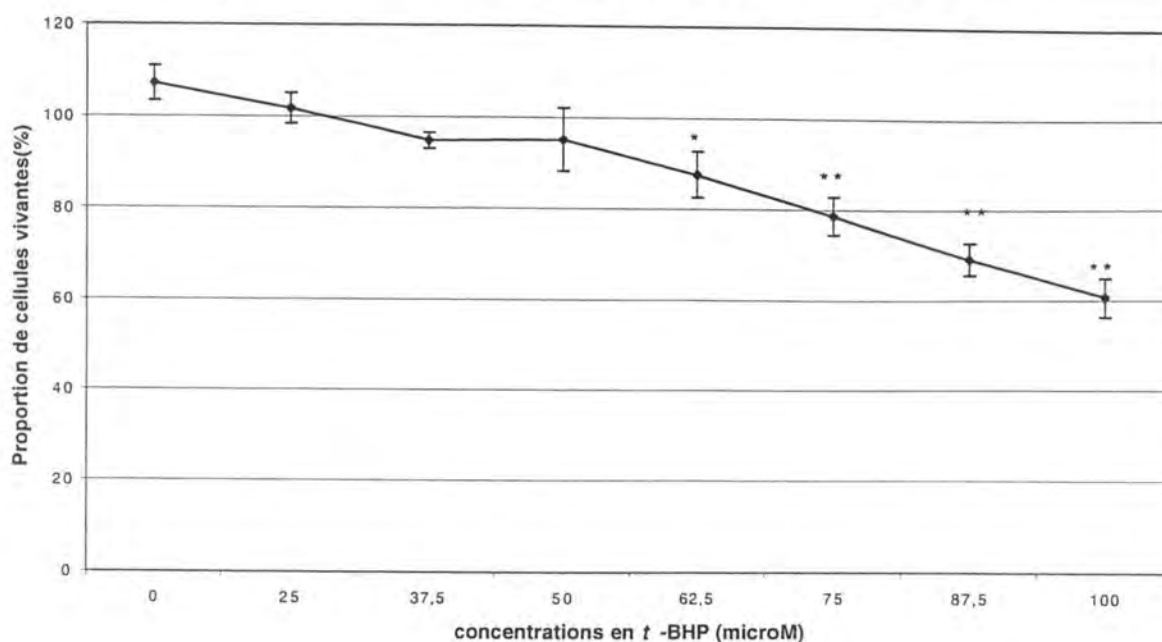


Fig III-7 : Courbe représentant la survie cellulaire 24h après un stress unique de 2 h avec des concentrations croissantes de *t*-BHP sur des FHD WI-38 h-TERT. Les 100% représentent le nombre de cellules vivantes présentes au moment du stress (échantillons Jour 0). (Valeur de D.O. ($\lambda=570$ nm) = $0,144 \pm 0,004$)

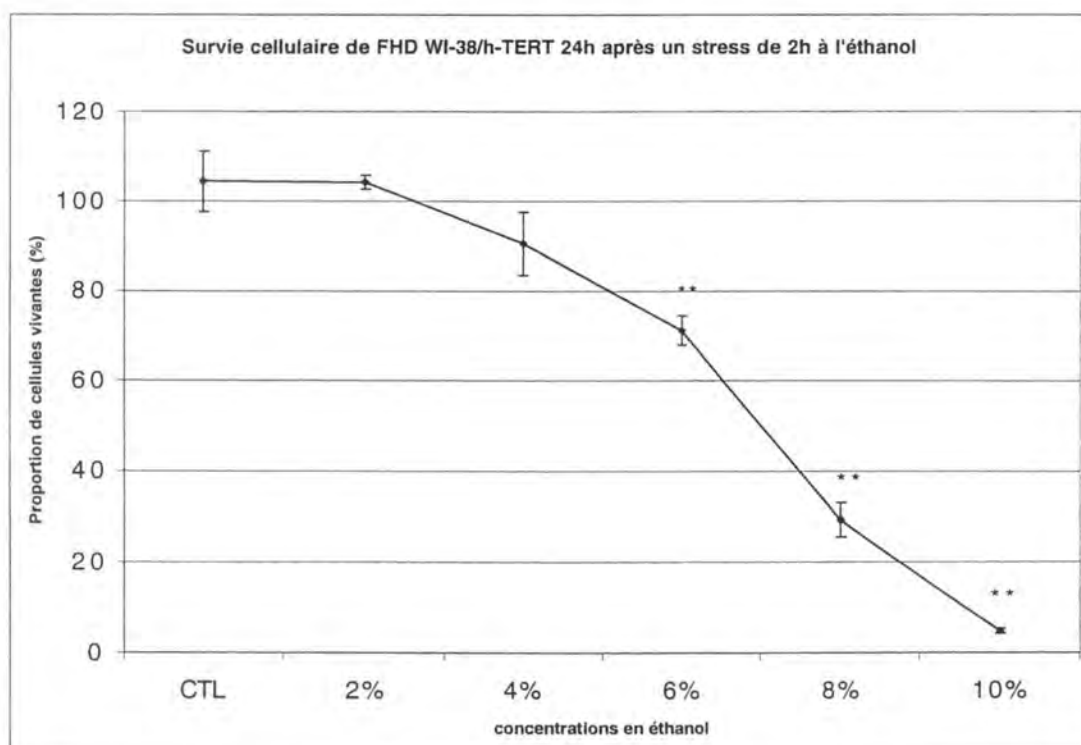


Fig III-8 Courbe représentant la survie cellulaire 24h après un stress unique de 2 h avec des concentrations croissantes d'éthanol sur des FHD WI-38 h-TERT. Les 100% représentent le nombre de cellules vivantes présentes au moment du stress (échantillons Jour 0) (Valeur de D.O. ($\lambda=570$ nm) = $0,173 \pm 0,007$)

2. Mise au point de modèles de SIPS au t-BHP et à l'éthanol sur des FHD WI-38/h-TERT

La seconde partie de notre travail a été consacrée à la mise au point de modèles de SIPS induite par un stress unique au t-BHP ou à l'éthanol sur une lignée de FHD WI-38 immortalisés par l'expression ectopique de la sous-unité catalytique de la télomérase. Cette lignée est appelée WI-38/h-TERT.

2-a) Détermination de la dose subcytotoxique d'agent stressant

- Stress au t-BHP : (Fig. III-7)

Résultats

La concentration de t-BHP à partir de laquelle nous commençons à observer une diminution hautement significative de la proportion de cellules vivantes par rapport au nombre de cellules présentes en début de stress est de 62,5 μ M.

Discussion

Dans cette expérience, la concentration subcytotoxique de t-BHP, c'est-à-dire celle pour laquelle on n'observe pas de mortalité cellulaire est de 50 μ M. A une concentration de 87,5 μ M de t-BHP, le nombre de cellules vivantes diminue de 12,3% \pm 5, cette proportion augmente pour les concentrations plus élevées en t-BHP.

- Stress à l'éthanol : (Fig. III-8)

Résultats

La concentration d'éthanol à partir de laquelle nous commençons à observer une diminution hautement significative de la proportion de cellules vivantes par rapport au nombre de cellules présentes en début de stress est de 6%.

Discussion

Dans cette expérience, la concentration subcytotoxique d'éthanol, c'est-à-dire celle pour laquelle on n'observe pas une mortalité cellulaire significative est de 4%. A une concentration de 6%, le nombre de cellules vivantes diminue de 28,9% \pm 3,3, cette proportion augmente pour les concentrations plus élevées en éthanol.

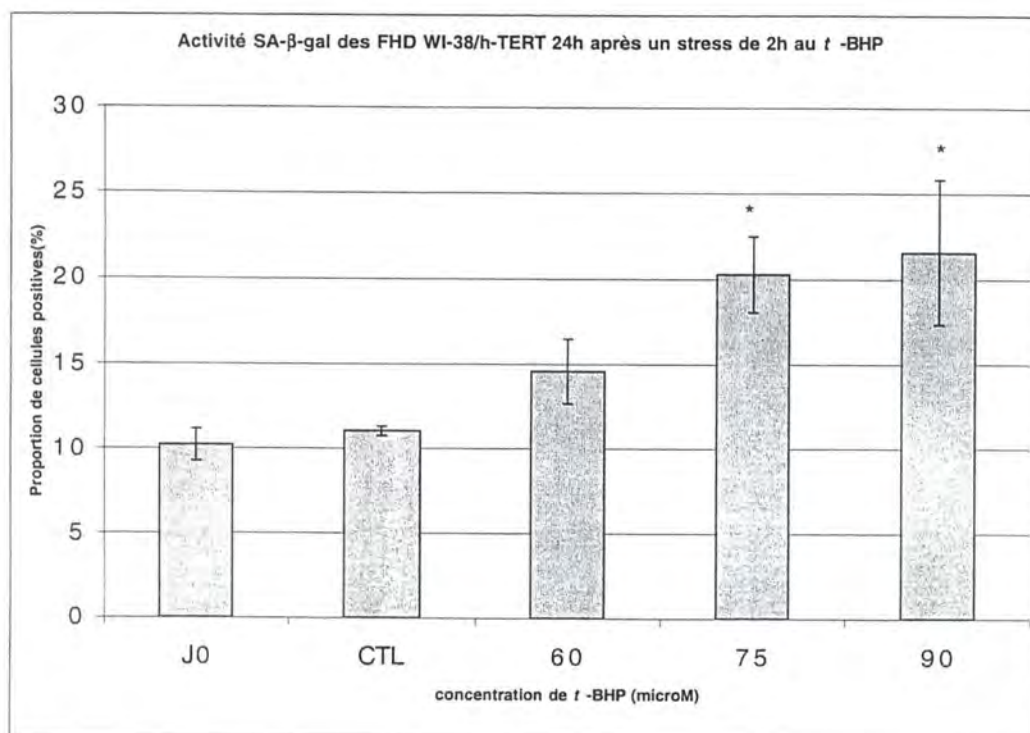


Fig III-9 Proportion de cellules positives pour l'activité SA- β -Galactosidase 24h après un stress unique de 2 h avec des concentrations croissantes de t-BHP sur des FHD WI-38 h-TERT

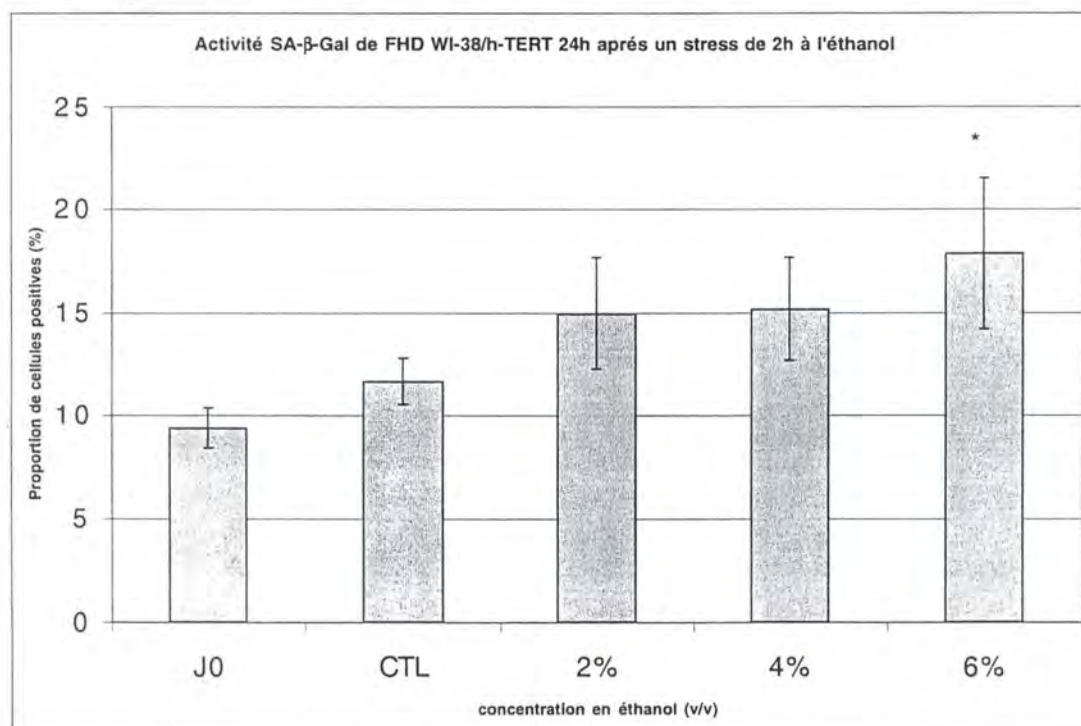


Fig III-10 Proportion de cellules positives pour l'activité SA- β -Galactosidase 24h après un stress unique de 2 h avec des concentrations croissantes d'éthanol sur des FHD WI-38/ h-TERT.

2-b) Détermination de la dose d'agent stressant nécessaire pour induire la SIPS

- Stress au *t*-BHP :

** Cellules positives pour l'activité SA- β -gal (Fig. III-9)*

• Résultats

Nous observons que la concentration de 60 μ M de *t*-BHP n'entraîne pas d'augmentation significative de la proportion de FHD WI-38/h-TERT positives pour l'activité SA- β galactosidase. Ce n'est qu'à partir d'une concentration de *t*-BHP de 75 μ M que nous observons une augmentation significative de cette proportion (de 20,3 % \pm 2,2 contre 11% \pm 0,3 pour le contrôle).

• Discussion

L'activité SA- β -gal n'est induite qu'à partir d'une concentration de 75 μ M de *t*-BHP, ce qui correspond à une concentration supérieure à la concentration subcytotoxique de *t*-BHP. On observe une augmentation de l'activité SA- β -gal de 9.3% \pm 2.2 chez les cellules stressées avec 75 μ M de *t*-BHP, et une augmentation de 10.5% \pm 4.2 chez les cellules stressées avec 90 μ M de *t*-BHP.

- Stress à l'éthanol :

** Cellules positives pour l'activité SA- β -gal (Fig. III-10)*

Résultats

Nous observons que les concentrations de 2% et 4% d'éthanol n'entraînent pas d'augmentation significative de la proportion de FHD WI-38 positives pour l'activité SA- β galactosidase. Ce n'est qu'à partir d'une concentration de 6% d'éthanol que nous observons une augmentation significative de cette proportion (6.2% \pm 3.6).

Discussion

L'activité SA- β -gal n'est induite qu'à une concentration d'éthanol de 6%, ce qui correspond à une dose supérieure à la concentration subcytotoxique d'éthanol de 4%.

2-c) Conclusion

Nous observons que les concentrations subcytotoxiques déterminées 24 h après un stress de 2 heures sur des FHD WI-38 /h-TERT sont de 50 μ M de *t*-BHP et de 4 % d'éthanol. Les expériences de détermination de l'activité SA- β -gal des cellules montrent que la dose d'agent stressant nécessaire pour induire la SIPS est supérieure à la dose subcytotoxique.

Conclusions
et
Perspectives

IV : Conclusions et perspectives

L'apparition du phénotype sénescence induit prématurément par 5 stress répétés au *tert*-butyl hydroperoxyde ou à l'éthanol chez des fibroblastes jeunes de la souche WI-38 s'accompagne de la variation de l'expression de certains gènes comme l'a montré une étude du transcriptome de ces cellules réalisée au sein de notre laboratoire.

Une étude visant à surexprimer certains de ces gènes afin d'évaluer leur rôle dans l'apparition du phénotype sénescence est actuellement envisagée, mais sa mise en œuvre nécessite l'adaptation du modèle de SIPS existant, ce que nous avons réalisé au cours de notre mémoire.

La première adaptation réalisée concerne la réduction de la durée dans le temps du modèle. Dans le modèle à 5 stress, la durée est de 8 jours entre le premier stress et l'analyse du phénotype, ce qui est incompatible avec l'utilisation de transfections transitoires car l'expression ectopique d'un gène chute après environ 3 jours. Nous avons voulu mettre au point un modèle de SIPS avec un stress unique au *t*-BHP ou à l'éthanol chez des fibroblastes WI-38.

Dans le modèle à 5 stress, la SIPS est déclenchée par des doses subcytotoxiques d'agent stressant. C'est-à-dire des doses situées juste en dessous de la concentration d'agent stressant qui tue une partie de la population cellulaire. Nous avons donc réalisé des courbes de survie des fibroblastes WI-38, un jour après un stress unique de 2 heures au *t*-BHP ou à l'éthanol. Les concentrations subcytotoxiques observées sont respectivement de 30 μ M et de 4 %.

Nous avons ensuite déterminé la dose d'agent stressant nécessaire pour déclencher la SIPS chez les fibroblastes WI-38 après un stress unique de 2 heures au *t*-BHP ou à l'éthanol. Pour ce faire, deux biomarqueurs ont été évalués. Il s'agit d'une part de la proportion de cellules positives pour l'activité SA- β -galactosidase, et d'autre part du potentiel prolifératif mesuré par l'incorporation de thymidine tritiée. Nous observons que les doses subcytotoxiques de *t*-BHP ou d'éthanol sont suffisantes pour inhiber la prolifération cellulaire, mais pas pour augmenter la proportion de cellules positives pour l'activité SA- β -galactosidase. Ceci montre que, bien que leur prolifération soit ralentie, une dose subcytotoxique d'agent stressant n'est pas suffisante pour faire apparaître la SIPS après un stress unique chez des fibroblastes WI-38. Nos résultats montrent pourtant que la SIPS peut être induite après un stress unique chez ces fibroblastes, mais à des doses d'agent stressant qui tuent environ 20 % de la population cellulaire.

Il serait intéressant de valider ce modèle de SIPS à stress unique par l'étude d'autres biomarqueurs de la sénescence (par exemple en mesurant la surexpression de certains gènes comme l'apolipoprotéine J, la fibronectine, l'ostéonectine, etc.). Toutefois, l'évaluation de l'activité SA- β -galactosidase dans la population cellulaire est un biomarqueur fiable et généralement bien accepté dans la littérature. Ceci nous laisse penser que nous avons atteint le premier objectif de ce travail puisque nous avons mis au point un modèle de SIPS avec un stress unique chez des fibroblastes WI-38, dans lequel le phénotype sénescence des cellules peut être évalué 24 heures après le stress. Ce modèle pourra être utilisé pour l'analyse fonctionnelle de certains gènes surexprimés de manière transitoire chez des fibroblastes WI-38.

Bien que facilement réalisable avec des fibroblastes de la souche WI-38, la transfection transitoire présente un inconvénient notoire: seule une certaine proportion de la population cellulaire exprime le transgène. Pour contourner ce problème, il faut réaliser une transfection stable, qui se différencie de la transfection transitoire par une étape de sélection des cellules qui ont intégré le transgène dans leur génome. Ce processus, relativement long en terme de divisions cellulaires, n'est pas réalisable avec les fibroblastes de la souche WI-38 dans le cadre de l'étude de la SIPS. En effet, les cellules en fin de sélection seraient déjà proches de la sénescence répllicative, et posséderaient donc déjà des biomarqueurs de la sénescence.

Le deuxième objectif de notre travail était de mettre au point un modèle de SIPS à stress unique sur des fibroblastes immortalisés de la lignée WI-38/h-TERT. L'utilisation d'une lignée de fibroblastes immortels permet de réaliser des transfections stables car la phase de sélection des cellules ayant intégré le transgène n'est pas limitante puisque ces cellules échappent à la sénescence répllicative.

Tout comme nous l'avons fait auparavant avec les fibroblastes de la souche WI-38, nous avons commencé par réaliser une courbe de survie cellulaire, 24 heures après un stress unique de 2 heures au *t*-BHP ou à l'éthanol afin d'établir la dose subcytotoxique d'agent stressant pour les fibroblastes de la lignée WI-38/h-TERT. La concentration subcytotoxique de *t*-BHP s'est révélée être de 50 μ M tandis que celle d'éthanol est de 4 %.

Nous avons ensuite déterminé la dose d'agent stressant nécessaire pour déclencher la SIPS chez les fibroblastes WI-38/h-TERT. La concentration de *t*-BHP nécessaire pour augmenter la proportion de WI-38/h-TERT positives pour l'activité SA- β -galactosidase est de 75 μ M tandis que celle d'éthanol est de 6 %, ces concentrations entraînent la mortalité d'une fraction de la population cellulaire de l'ordre de 20 % pour le stress au *t*-BHP et à 30 % pour celui à l'éthanol. Ces résultats montrent que la SIPS peut être induite par un stress unique de 2 heures au *t*-BHP ou à l'éthanol chez les fibroblastes immortalisés de la lignée WI-38/h-TERT. Ce modèle pourra donc être utilisé pour l'analyse fonctionnelle de gènes transfectés de manière stable chez des fibroblastes de la lignée WI-38/h-TERT.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus avec la souche parentale WI-38. Ils montrent que, dans un modèle de SIPS avec un stress unique de 2 heures au *t*-BHP ou à l'éthanol, il faut tuer au moins 20 % de la population cellulaire pour que les cellules survivantes entrent en SIPS.

En résumé, notre travail a permis la mise au point d'un modèle de SIPS avec un stress unique de 2 heures au *t*-BHP ou à l'éthanol sur des fibroblastes de la souche WI-38 et sur la lignée de fibroblastes immortalisés WI-38/h-TERT. Ces modèles vont pouvoir être utilisés pour l'analyse fonctionnelle du rôle de certains gènes potentiellement impliqués dans l'apparition du phénotype sénescence lors de la SIPS.

Bibliographie

V : Bibliographie :

- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M. and Francz, P.I. (1988) Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5112-5116.
- Brazeau, G.A. and Fung, H.L. (1990) Mechanisms of creatine kinase release from isolated rat skeletal muscles damaged by propylene glycol and ethanol. *J Pharm Sci*, **79**, 393-397.
- Campisi, J. (1999) *Replicative senescence and immortalization*.
- Campisi, J., Dimri, G. and Hara, E. (1996a) Control of replicative senescence. In Schneider, E. and Rowe, J. (eds.), *Handbook of the biology of aging*. Academic Press, New York, pp. 121-149.
- Cristofalo, V.J., Volker, C., Francis, M.K. and Tresini, M. (1998) Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **8**, 43-80.
- de Magalhaes, J.P., Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett*, **523**, 157-162.
- Dierick, J.-F., C.Frippiat, M.Salmon, F.Chainiaux, and O.Toussaint. (2003) Stress, Cells and Tissue Aging. *Modulating Aging and Longevity*, 101-125.
- Dierick, J.F., Eliaers, F., Remacle, J., Raes, M., Fey, S.J., Larsen, P.M. and Toussaint, O. (2002a) Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem Pharmacol*, **64**, 1011-1017.
- Dierick, J.F., Kalume, D.E., Wenders, F., Salmon, M., Dieu, M., Raes, M., Roepstorff, P. and Toussaint, O. (2002b) Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Lett*, **531**, 499-504.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Frippiat, C., Mazarati, J.B., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000) Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*, **28**, 361-373.
- Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E.S. and Toussaint, O. (2002) Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones*, **7**, 23-35.
- Frippiat, C., Dewelle, J., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, **33**, 1334-1346.
- Gorbunova, V., Seluanov, A. and Pereira-Smith, O.M. (2002) Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem*, **277**, 38540-38549.
- Granger, M.P., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2002) Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol*, **41**, 29-40.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-460.
- Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, **25**, 585-621.
- Jayme, D. (2001) Cell Culture Media. *Encyclopedia of life sciences*.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J.D. (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, **113** (Pt 20), 3613-3622.

- Ochi, T. and Miyaura, S. (1989) Cytotoxicity of an organic hydroperoxide and cellular antioxidant defense system against hydroperoxides in cultured mammalian cells. *Toxicology*, **55**, 69-82.
- Pines, J. (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinase : a biochemical view. *Biochem J*, **308**, 679-711.
- Rodemann, H.P., Bayreuther, K., Francz, P.I., Dittmann, K. and Albiez, M. (1989) Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Experimental Cell Research*, **180**, 84-93.
- Shay, J.W. and Wright, W.E. (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 72-76.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, **91**, 325-334.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Docke, W. and Lotze, C. (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res*, **220**, 186-193.

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

16 JUIN 2004